



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Projektowanie Starterów – pojęcia podstawowe, przeгляд programów do tworzenia układów amplifikacyjnych

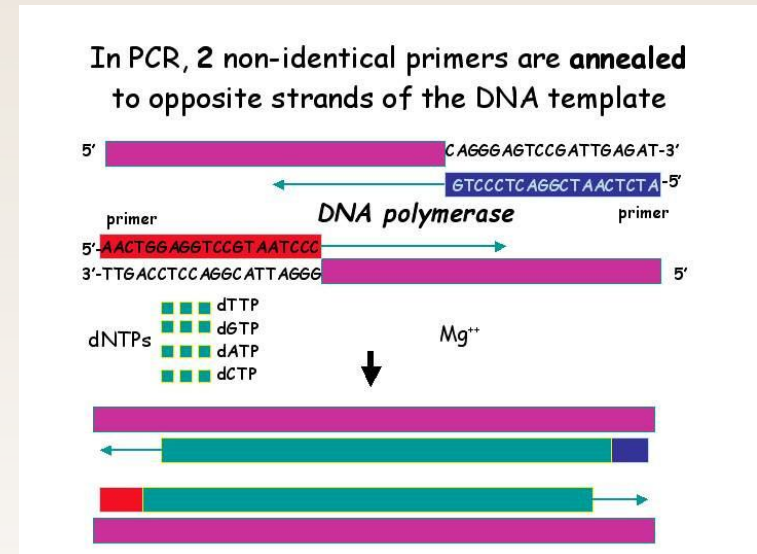
Dr inż. Bartosz Kozak

Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,

Zakład Biotechnologii Roślin

Starter

- Oligonukleotyd DNA lub RNA służący do startu polimeryzacji przez polimerazę DNA
- Sekwencja 5'-3'-OH
- Synteza z końca 3'



Startery - oczyszczanie

- Metody oczyszczania
 - DST, desalted - Usuwanie soli i zanieczyszczeń na kolumnie chromatograficznej – brak usuwania ON niespecyficycznych – wystarczające do większości zastosowań
 - RP, cartridge – chromatografia odwrócona, usuwanie zanieczyszczeń i ON niespecyficycznych
 - HPLC – HPLC odwrócona, b. wysoka jakość >85% pełnej długości ON. Przydatne do diagnostyki oraz ON >30 nt
 - PAGE – metoda usuwania ON fałszywych na podstawie sekwencji i masy. Najwyższa jakość - >85% pełnej długości ON

PROGRAMY PRZYDATNE W PROJEKTOWANIU UKŁADÓW PCR/QPCR

- Bazy danych
 - ENSEMBL, NCBI (BLAST),
- Programy do projektowania/analizy układów PCR/QPCR
 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
 - <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
 - <https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
- Programy do analizy t. topn. starterów
 - <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
 - <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>

METODY OBLICZEN TEMP. TOPNIENIA STARTERÓW

- Temperatura, przy której co najmniej połowa dupleksów DNA występuje w formie zdenaturowanej (jednoniciowej) i jest miara stabilności dsDNA (def.)

BASIC MELTING TEMP

- Dla $ON < 14$ nt
- $T_m = (wA + xT) * 2 + (yG + zC) * 4$
- Gdzie w, x, y, z - ilości odpowiednich nt
- Dla $ON > 14$ nt
- $T_m = 64.9 + 41 * (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$
 - Dla warunków 50 nM [starter], 50 mM [Na⁺], i pH 7,0.

Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., and Itakura, K. (1979) *Nucleic Acids Res* 6:3543-3557 (Abstract) and Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY. (CHSL Press)

SALT ADJUSTED MELTING TEMPERATURE

- ogólnie
 - $T_m = (wA+xT)*2 + (yG+zC)*4 - 16.6*\log_{10}(0.050) + 16.6*\log_{10}([Na+])$
 - Gdzie $[Na+] = [Na+] + 4x [Mg^{2+}]$
- Dla ON 18-25 nt
 - $T_m = 100.5 + (41 * (yG+zC)/(wA+xT+yG+zC)) (820/(wA+xT+yG+zC)) + 16.6*\log_{10}([Na+])$
- **OBLICZANIE T_m WYKORZYSTYWANE PRZEZ CZĘŚĆ APLIKACJI**

Sambrink, J., and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY

NEAREST NEIGHBOR TEMPERATURE

- REKOMENDOWANA METODA OBLICZEN (automatycznie obliczana)
- $T_m(^{\circ}\text{C}) = \{\Delta H / \Delta S + R \ln(C)\} - 273.15$
- Gdzie ΔH (kcal/mol) – zmiana entalpii, jako miary energii cieplnej substancji. ΔH obliczanej jest poprzez sumowanie H wszystkich par dinukleotydowych
- ΔS (kcal/mol) – zmiana entropii układu czyli miary nieporządku układu. Pomiar dla entropii najbliższych sąsiadujących dinukleotydów (Nearest Neighbor method)
 - Salt correction - uwzględnia zachowanie ON w buforze Na^+
 - ΔS (salt correction) = ΔS (1M NaCl) + $0,368 \times N \times \ln([\text{Na}^+])$
 - Gdzie N – ilość par nukleotydowych ON (długość ON-1)
 - $[\text{Na}^+]$ - ekwiwalent jonów w mM
 - $[\text{Na}^+] = \text{stezenie } [\text{Na}^+] + 4 \times \{\text{wolne } \text{Mg}^{2+}\}$

NEAREST NEIGHBOR TEMPERATURE

$$T = \frac{\Delta H - 3,4 \frac{\text{kcal}}{\text{K mole}}}{\Delta S + R \ln \left(\frac{1}{[\text{primer}]} \right)} + 16,6 \log_{10} ([Na^+])$$

[Na+]= stezenie [Na+] + 4x {wolne Mg2+}

Zalezy od:

Stężenia ON

Stężenia Mg2+

Stężenia dNTP

SantaLucia J., Burkard M.E., Kierzek R., Schroeder S.J., Jiao X., Cox C., Turner D.H. (1998)
Biochemistry 37:14719-14735

SIGMA-Aldrich – temp. są zdecydowanie zawyżone, gdyż [prime]=0,5 mM!

TEMP. TOPNIENIA PARY STARTERÓW - UWAGI

- Temperatura powinna być jak najwyższa, ale nie powinna przekroczyć $>5^{\circ}\text{C}$ dla T niższej
- Obniżanie T_{topn} ↓ selektywność, ↑ wydajność, skrócenie fazy lag – obniża próg detekcji (niższe C_t w QPCR)
- Podwyższanie T_{topn} ↑ selektywność, ↓ wydajność, wydłużenie fazy lag – podnosi próg detekcji (wyższe C_t w QPCR)
- Regulacja T_{topn} – Mg^{2+} ; ↓ selektywność, ↑ wydajność

SŁOWNICZEK POJEC ZWIĄZANYCH Z PROJEKTOWANIEM STARTERÓW 1

- GC content: odsetek C i G w całym ON
 - Powinien być w granicach 40-60
- GC clamp: obecność G lub C w ostatnich 5 nt od końca 3', która pomaga w mocnej hybrydyzacji starter = matryca DNA.
 - Unikać więcej niż 3 G lub C na ostatnich 5 nt
- Primer annaling temp: obliczona temp. hybrydyzacji starter-matrycowe DNA:
$$T_a = 0.3 \times T_m(\text{starter}) + 0.7 T_m (\text{produkt}) - 14.9$$
 - Wymaga znajomości sekwencji produktu

SŁOWNICZEK POJEC ZWIĄZANYCH Z PROJEKTOWANIEM STARTERÓW 2

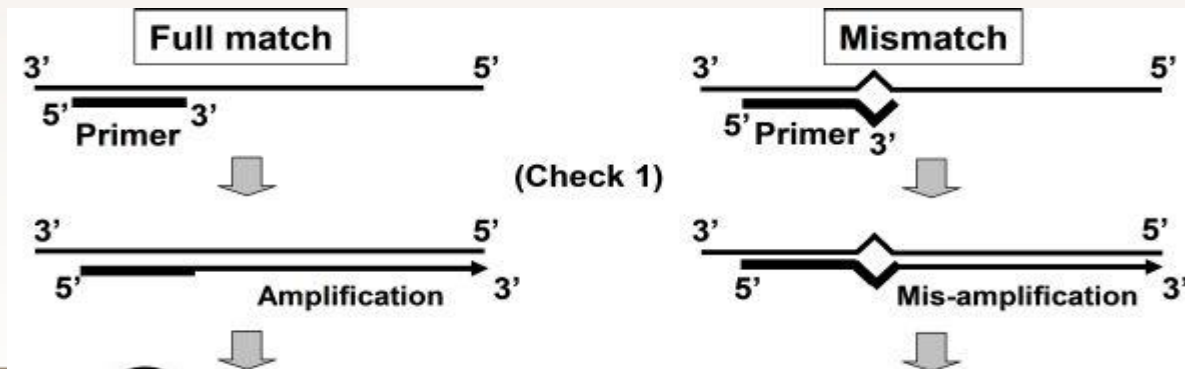
- Repeats: powtórzenia dinukleotydowe, szczególnie AT
 - więcej niż x4 powinny być unikane
- Runs (poly-X): powtórzenia pojedynczego nukleotydu
 - Unikać więcej niż 4, >x 3 na końcu 3'

SŁOWNICZEK POJEC ZWIĄZANYCH Z PROJEKTOWANIEM STARTERÓW 3

- Primer secondary structure: tworzenie struktur 2-rzędowych wewnątrz ON lub pomiędzy para starterów.
- Skutkuje niska wydajnością ze względu na brak dostępności starterów ssDNA do tworzenia hybrydy z DNA
- ΔG – energia swobodna Gibbsa – miara spontaniczności formacji najbardziej stabilnego dupleksu nukleotydowego w danej temperaturze;
- $\Delta G < 0$ – powstanie hybrydy jest prawdopodobne,
- $\Delta G > 0$ – powstanie hybrydy jest mało prawdopodobne

SŁOWNICZEK 4: 3' END STABILITY

- 3' End stability: maksymalna wartość ΔG 5 ostatnich nt końca 3' STARTERA z matrycowym DNA.
 - $\downarrow \Delta G < 12$ kcal/mol – skutkuje polimeryzacją DNA z
 - nie do końca poprawnie sparowanego startera z DNA
 - Generalnie $\Delta G > -12$ kcal/mol



SŁOWNICZEK 5: SELF DIMER MAXIMUM ΔG (3' END)

- Self Dimer Maximum ΔG (3' End) – energia swobodna Gibbsa jako miara spontaniczności powstawania hybryd pomiędzy końcami 3' tego samego startera.
- $\downarrow \Delta G < 0$ kcal/mol określa większe prawdopodobieństwo powstania dupleksu primer – primer niż primer-DNA
- Generalnie $\Delta G \geq -5$ kcal/mol dla PCR

SŁOWNICZEK 6: PRIMER HAIRPIN FORMATION

- Hairpin maximum ΔG - energia potrzebna do hybrydyzacji pomiędzy wewnętrznymi nt startera z utworzeniem struktury szpilki do włosów
- $\downarrow \Delta G < 0$ kcal/mol określa większe prawdopodobieństwo powstania stabilnej struktury hairpin \rightarrow spadek wydajności PCR
- Generalnie
 $\Delta G \geq -6$ kcal/mol dla PCR