

W01: Replikacja DNA, zadania

Reakcja PCR.

Kornelia Polok

1. Projektowanie starterów

1.1. Poniżej podano sekwencję pewnego genu w formacie FASTA.

```
>rpqip1
60  ACTACGCTCTCATCCCAAACCCAAAATCATGATGGACTTCAAGCTCTTCTCCCTAACCT
120  TCTCTTCTCCACAATCCTTACCCCAGCTCTCTCCGAGCTCTGTAACCCTAAAGACAAAA
180  GGTGCTCTTCGAAATCAAGACAGCCTTCAACAACCCCTACATTTTATCCTCATGGAAATC
240  CGACGCCGACTGCTGTACCGACTGGTACTGCGTTCGAGTGTGATCCCACCACCCACCGCAT
300  CAACTCCCTCACCATCTTCACCGACAACAACCTCACCGGCCAAATCCCCGCCAAGTCGG
360  AGACTTGCCGTACCTAGAAACCTCGAGCTCCGCAAGCTCCCCATCTCACTGGTCCAAT
420  CCAGCCCTCCATCGCCAAGCTTAAACATCTCAAGATGCTCAGGCTCAGCTGGAACGGCCT
480  CTCAGTTTCAGTCCCTGACTTCATCAGCCAGCTCAAGAACCTCACATTCTCGAACTCAA
540  CTTCAACAAATTCAGTGGCTCCATCCCAGCTCGCTTTCTCAGCTACCCAATTGGGAGC
600  CCTTCATCTAGATCGCAACCAGCTCACAGGTCAAATTCCTAGTCTATTCGGAAAATTCGT
660  TGGCACCGTTCGGGCTCTCTTCTCTCCACAACCAGCTCACAGGAAAAATCCCAACCTC
720  ATTTGCTAACATGAACTTCGACCAAATAGACTTGTACGCAACAAGCTCGAAGGCGACGC
780  GTCTGTAATATTCGGTTTGAACAAGACCACCCAGATTGTGGATCTGTGAGGAACATGCT
840  GGAATTTGATCTGTCCAAAGTGGTGTTCGACCAGCTTGAGAGCCGTGGACTTGAACCA
900  TAACAGCATCACGGGGAGTATTCCGGCACAGTTGACCCAATTGGATGATTTGGTGTGTT
960  CAATGTGAGCTACAACAGTTGTGTGGTAAGATTCCGGTGGGTGGGAAGTTGCAGAGCTT
1020 GGACACCACGTCGTATTTCCATAACCGGTGCCTTTGCGGTGCTCCCCTCCAAGTTGCAA
1080 GTAATGGACGCCGGAACGAATAGTAATAGTTTGGTATTGTAAAGGTGTTTCCTAAAACAG
1140 CGTGGCTTGATTGCTTCAAGCAAATAAGCAAATACGTTTACTTTTATAAACATTGGGTTT
1200 AATTAATGTAGGTCCAACAATCGACCACAAATTAGGCATTTTGTATGGATAAGCTATCAG
1252 AATAAAGAACTCACTATATGAATTGTTTGCTTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

1.2. Proszę zaprojektować do podanej sekwencji 20-nukleotydowe startery tak aby spełniały one następujące warunki:

- W miarę możliwości startery pozwolą na amplifikację całego genu.
- Każdy ze starterów będzie zawierał >50% par G+C?
- Temperatury topnienia starterów będą różniły się co najwyżej o 5°C.

1.3. Odpowiedź proszę podać według następującego schematu:

- A. Proszę pokazać miejsce przyłączenia starterów na rysunku. Można pokazać tylko te fragmenty, gdzie startery są przyłączane. Środek sekwencji można pominąć.
- B. Proszę podać sekwencje obu starterów od końca 5' do 3'
- C. Proszę podać temperaturę topnienia starterów.
- D. Proszę ustalić temperaturę przyłączania starterów w reakcji PCR.

Prawidłowe wykonanie zadania 1: 2 punkty

Termin: 17.03.2020.

Ocena prac: 22.03.2020.

2. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej: obliczanie stężeń.

2.1. Obiekt badań i liczebność prób

- Analizą należy objąć 12 szczepów *Mycobacterium tuberculosis*.
- Każdy szczep jest reprezentowany przez 2 próby.

2.2. Analizowana sekwencja

- W analizie należy wykorzystać sekwencję unikalną, fragment genu *katG*, dla którego zaprojektowano dwa startery katG1-F i katG1-R.

2.3. Roztwory podstawowe i objętość reakcji

- Roztwór podstawowy to roztwór jakim dysponujemy, np. mamy MgCl₂ o stężeniu 25 mM, bufor o stężeniu 20 x itd.
- Należy określić ile każdego z roztworów podstawowych podanych w tabeli 1 należy pobrać aby otrzymać 20 µl roztworu o stężeniu podanym dla próby, np. stężenie MgCl₂ w próbce ma być 1.5 mM, bufor o stężeniu 1 x itd.
- Objętość mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby wynosi 20 µl.

L.p.	Składnik	Stężenie w próbce	Roztwór podstawowy	Ilość w próbce [µl]	Ilość dla prób [µl]
1	H ₂ O				
2.	Bufor: 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM Tris-HCl	1x	20 x stężony		
3.	MgCl ₂	1.5 mM	25 mM		
4.	Wzmacniacz (betaine)	1 X	10 x stężony		
5.	Nukleotydy: dNTP (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)	200 µM	10 mM		
6	Startery: katG1-F katG1-R	1 µM 1 µM	20 µM 20 µM		
7.	Polimeraza DNA, Tfl lub Taq	1 U	1U/ µl		
8.	DNA	60 ng	20 ng/ µl		
Objętość próby:					

Prawidłowe wykonanie zadania: 2 punkty

Termin: 17.03.2020.

Ocena prac: 22.03.2020.