

## Ćwiczenie 7

### Reakcja PCR: etapy. Zapis sekwencji w bankach genów (NCBI). Projektowanie starterów.

Prof. dr hab. Roman Zieliński

#### 1. PCR; etapy

##### 1.1. Pytania i zagadnienia

- 1.1.1. Jak przebiega replikacja DNA u wszystkich organizmów żywych?
- 1.1.2. Na czym polega reakcja PCR: reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)?
- 1.1.3. Jakie są niezbędne składniki reakcji PCR?

##### 1.2. Ćwiczenia

- 1.2.1. Dana jest sekwencja: 5'AATGCGGCTACCTATGCAAAA3'
  - Proszę narysować na schemacie replikację tej sekwencji. Ile cząsteczek DNA uzyskamy w wyniku jednorazowej replikacji?
  - Ile cząsteczek DNA uzyskamy jeżeli przeprowadzono PCR powyższej sekwencji, przy czym reakcję prowadzono przez 35 cykli a w mieszaninie wyjściowej była tylko jedna cząsteczka DNA o podanej sekwencji?
- 1.2.2. Proszę podzielić się na 5 grup.
  - Każda z grup opisuje jeden etap reakcji PCR, ale nie wymienia nazwy. Etap, który grupa opisuje zostanie uzgodniony z prowadzącym. W opisie można uwzględnić temperatury, czasy, odczynniki biorące udział oraz ogólną charakterystykę procesu.
  - Następnie każda z grup przedstawia co dzieje się podczas danego etapu reakcji PCR. Zadaniem pozostałych osób jest odgadnięcie przedstawianego etapu.

##### 1.3. Problemy

- 1.3.1. Czy reakcję PCR można nazwać replikacją *in vitro*? Uzasadnij odpowiedź.
- 1.3.2. Zastanów się, dlaczego reakcja PCR umożliwiła znaczący postęp w badaniach nad genomami, a przede wszystkim ich sekwencjonowaniem. Czy bez reakcji PCR byłoby możliwe sekwencjonowanie genomów na skalę jaką obserwuje się obecnie?

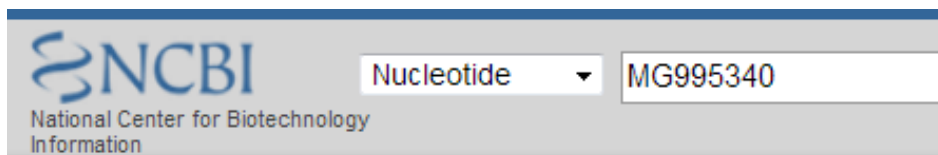
## 2. Zapis sekwencji w bankach genów

### 2.1. Pytania i zagadnienia

2.1.1. Co to jest nić sensowna i antysensowna?

### 2.2. Ćwiczenia

2.1. Proszę wejść na stronę NCBI i z rozwijanego menu po lewej stronie wybrać bazę nukleotydową: „nucleotide”. W oknie wyszukiwania proszę wpisać numer akcesyjny MG995340.



NCBI Home

Welcome to NCBI

- Proszę podać następujące informacje: długość sekwencji, czy sekwencję uzyskano na bazie DNA czy mRNA (pierwsza linijka), organizm, z którego pochodzi ta sekwencja, czy jest to cały gen, czy jest to DNA jądrowy czy organellowy (można odczytać z pozycji „source”), lokalizację sekwencji powtarzalnych, ruchomych, lokalizację regionów kodujących (CDS), pierwsze 5 aminokwasów kodowanych przez pierwszy wymieniony region kodujący tej sekwencji (odczytujemy z pozycji „CDS” i „translation”).
- Proszę scharakteryzować sposób zapisu sekwencji.
  - Czy są podane końce 5' i 3'?
  - Jeżeli nie są podane końce 5' i 3' to skąd wiadomo jaka jest polarność zdeponowanej sekwencji?
  - Jeżeli jest to cząsteczka DNA to sekwencja ilu nici jest podana? Dlaczego?
  - Co oznacza, że dana sekwencja jest sekwencją mRNA?
- Podana sekwencja domyślnie jest prezentowana w formacie GenBank.

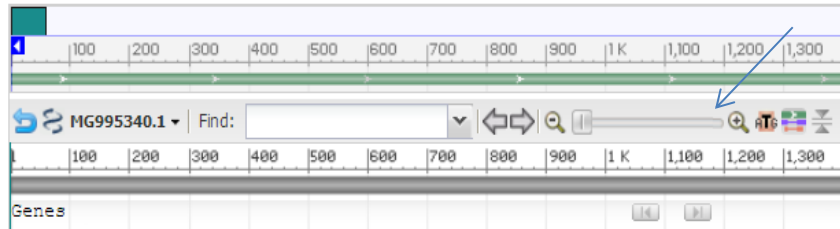
GenBank: MG995340.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS MG995340

- Sprawdź jak wygląda sekwencja w formacie „FASTA”? Podaj cechy tego formatu. Kiedy stosujemy format FASTA?
- Sprawdź widok Graphics. Manipulując widokiem „zoom” sprawdź jak zmienia się widok sekwencji?



2.2.2. Wykonaj podobne ćwiczenie dla następujących sekwencji: KF233882, DQ493649, NM\_144972.

### 3. Projektowanie starterów

#### 3.1. Pytania i zagadnienia

- 3.1.1. Jakie warunki muszą być spełnione przez dobry starter?
- 3.1.2. Ile starterów potrzeba aby zamplifikować gen o długości 1500 bp?
- 3.1.3. Ile par starterów należy zaprojektować aby gen o długości 1500 bp zamplifikować we fragmentach o długości kolejnych fragmentów, 250 bp, 400 bp, 850 bp. Gdzie powinny być zaprojektowane startery?

#### 3.2. Ćwiczenia

- 3.2.1. Pobierz ze strony kursu (<https://matgen.pl>) sekwencję PGIP (plik 05 PGIP-Fasta przy ćwiczeniu 5). Zaprojektuj do podanej sekwencji 20-nukleotydomowe startery tak aby zamplifikować w miarę możliwości cały gen? Projektowane startery powinny mieć >50% zasad z GC.
  - Podaj sekwencje obu starterów od 5' do 3'.
  - Dla każdego ze starterów pokaż na schemacie, do którego fragmentu genu są komplementarne (środek genu można pominąć, wystarczy narysować końce).
- 3.2.2. Oblicz temperaturę topnienia dla podanych starterów na podstawie danych z wykładu lub informacji przedstawionej na ćwiczeniach.
  - Jaka jest różnica temperatur topnienia dla podanych starterów?
  - Czy możliwe jest ustawienie temperatury przyłączenia starterów tak aby była ona zbliżona do temperatury topnienia obu starterów (+/- 5°C)?