



Εργαστηριακές ασκήσεις ΜΒ 2020

Άσκηση 3

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης

1983: σύλληψη της ιδέας, από τον Κ. Mullis (βραβείο Nobel Χημείας 1993)

" Driving up to Mendocino and thinking about an experiment to look at one particular letter of the genetic code, I designed a system in my mind. As I repaired the things I thought could go wrong with it, suddenly I generated something that if I did it over and over again would be PCR. It would go 2, 4, 8, 16, 32 . . . in 30 cycles make as many base pairs from one little region as I had in the whole genome! That was the eureka point. I said holy shit! By putting the triphosphates [DNA building blocks] in there myself, I could do this process over and over and amplify the DNA.

I slammed on the brakes and stopped by the side of the road to calculate it out. Jennifer objected groggily to the delay and the light, but I exclaimed I had discovered something fantastic. Unimpressed, she went back to sleep.

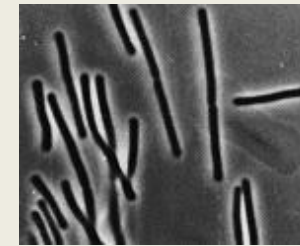
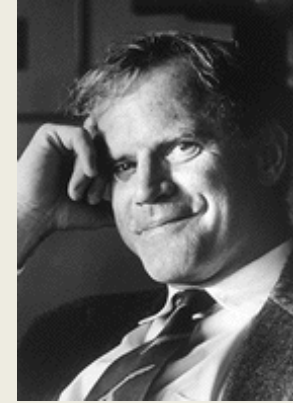
A couple of miles down the road I stopped again. I realized I could use these bastards, the oligonucleotides [short pieces of DNA], and get the enzymes to reproduce as big a piece as I wanted to. They didn't have to be aimed at just one base pair. Hell, I could do a whole sequence. I realized you can cut the sequence out from a great big molecule. Pretty cool! Just cut, paste, and amplify.»

Cetus Corporation sold the patent for PCR to Hoffman-LaRoche for the staggering \$300 million - the most money ever paid for a patent. Mullis meanwhile received a \$10,000 bonus.

1985: πρώτη δημοσίευση, Science 1985, 230:1350-1354

1988: θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, Science 1988, 239:487-491

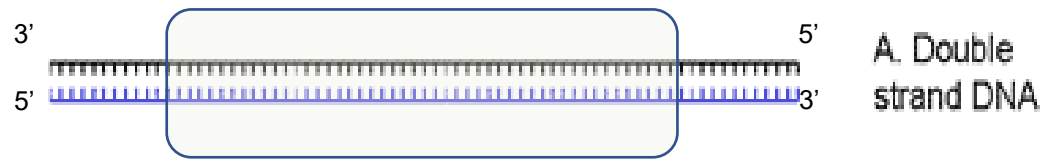
1988-σήμερα : Χιλιάδες άρθρα με εφαρμογές PCR – συνεχής εξέλιξη



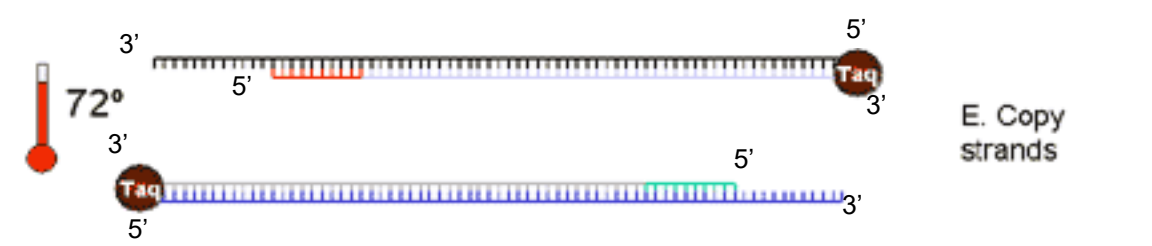
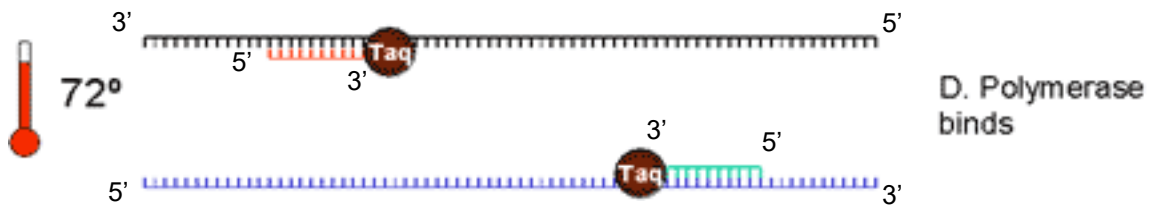
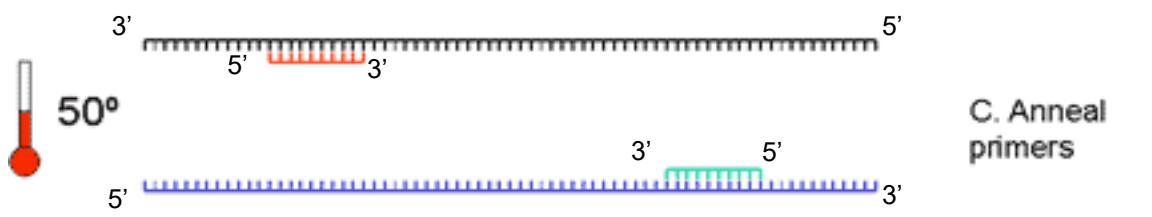
Thermus aquaticus



Yellow stone National Park, California



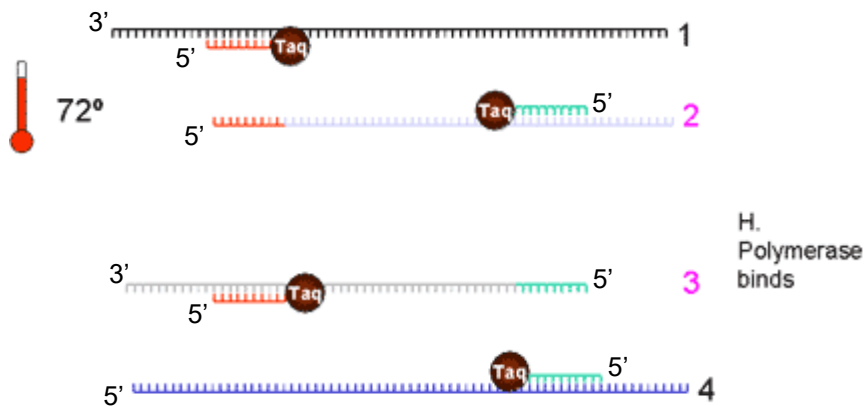
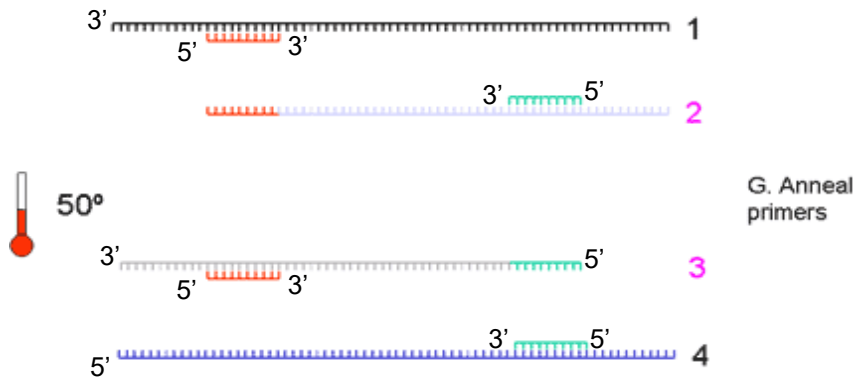
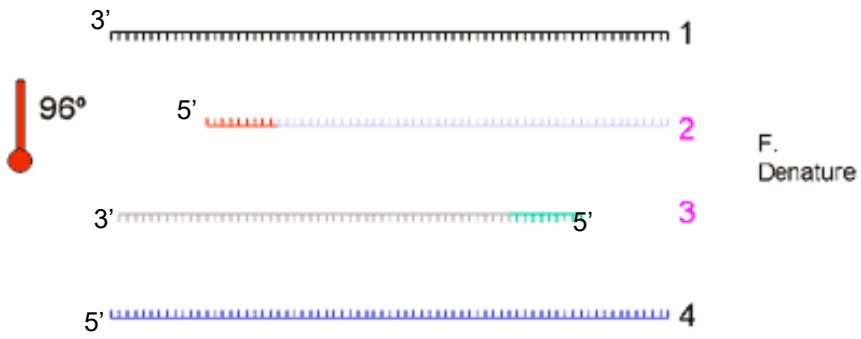
- 5' 3' Forward primer
- 3' 5' Reverse primer
- Taq polymerase
- dNTPs



1^{ος} κύκλος:

2 αντίγραφα – 4 αλυσίδες DNA:

2 μητρικές
2 νέες ακαθόριστου μήκους



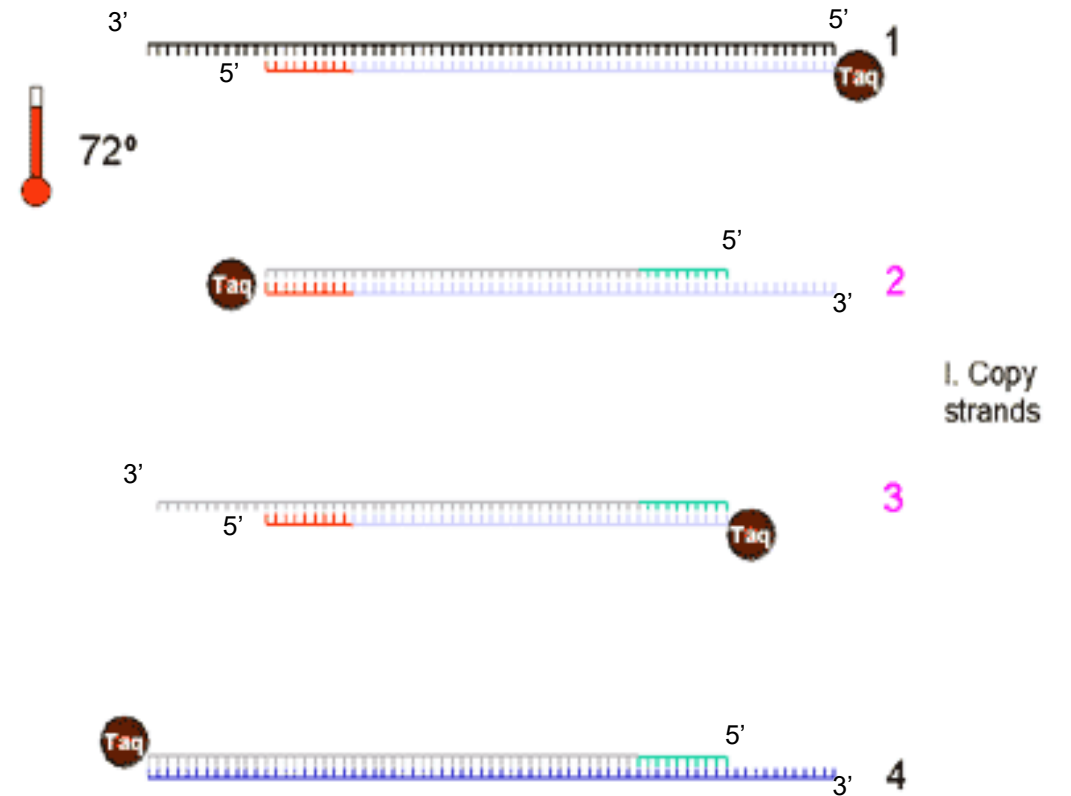
2^{ος} κύκλος:

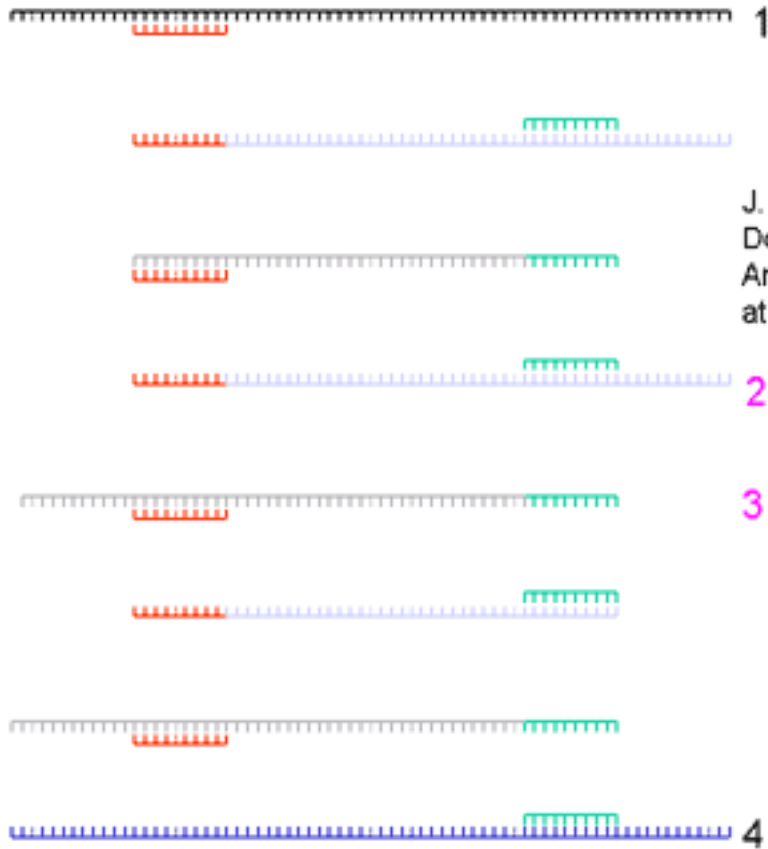
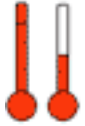
4 αντίγραφα – 8 αλυσίδες DNA

2 μητρικές

4 νέες ακαθόριστου μήκους

2 νέες επιθυμητού μήκους





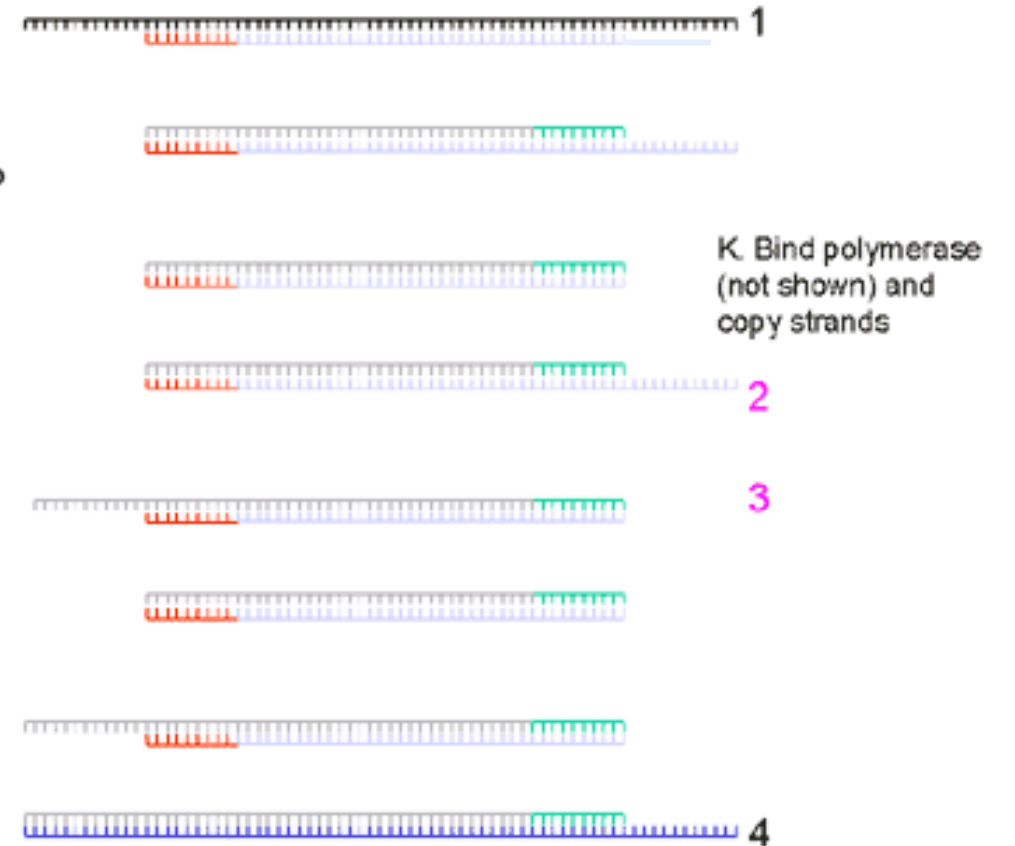
3^{ος} κύκλος:

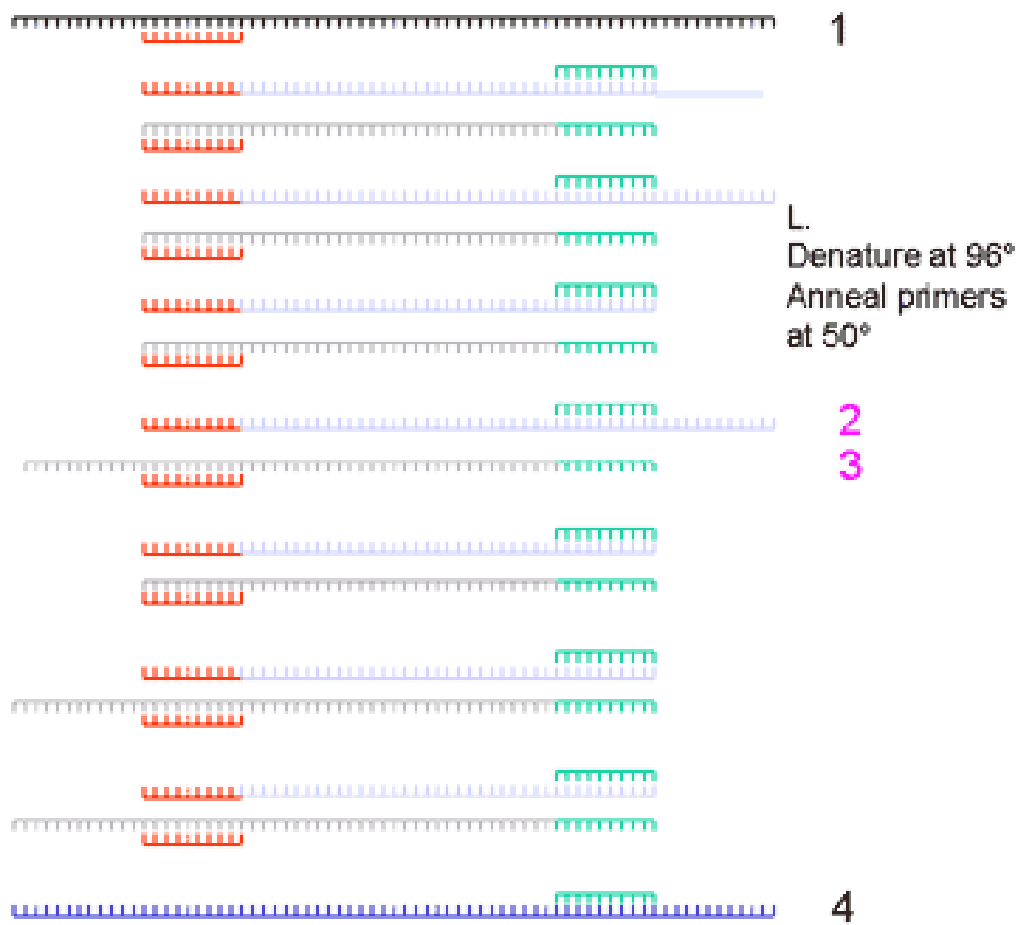
8 αντίγραφα – 16 αλυσίδες DNA:

2 μητρικές

6 νέες ακαθόριστου μήκους

8 νέες επιθυμητού μήκους





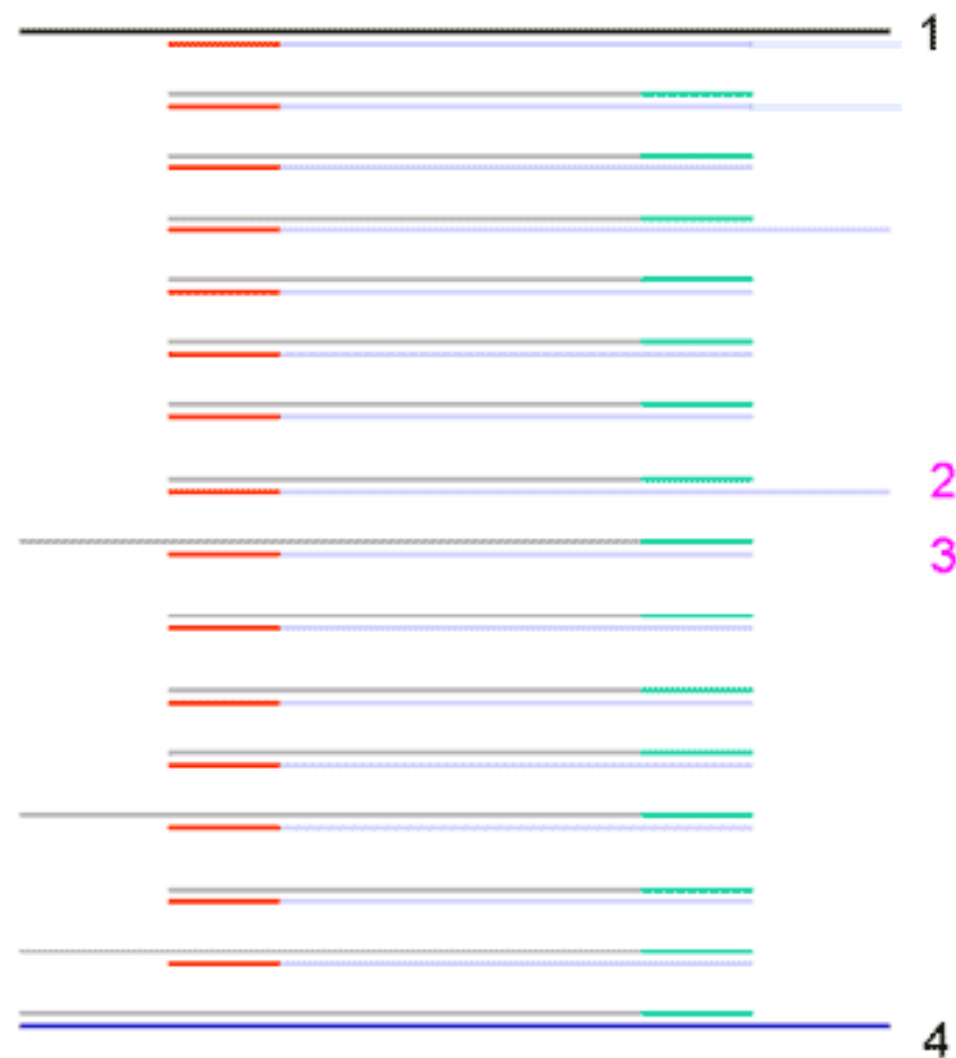
4^{ος} κύκλος:

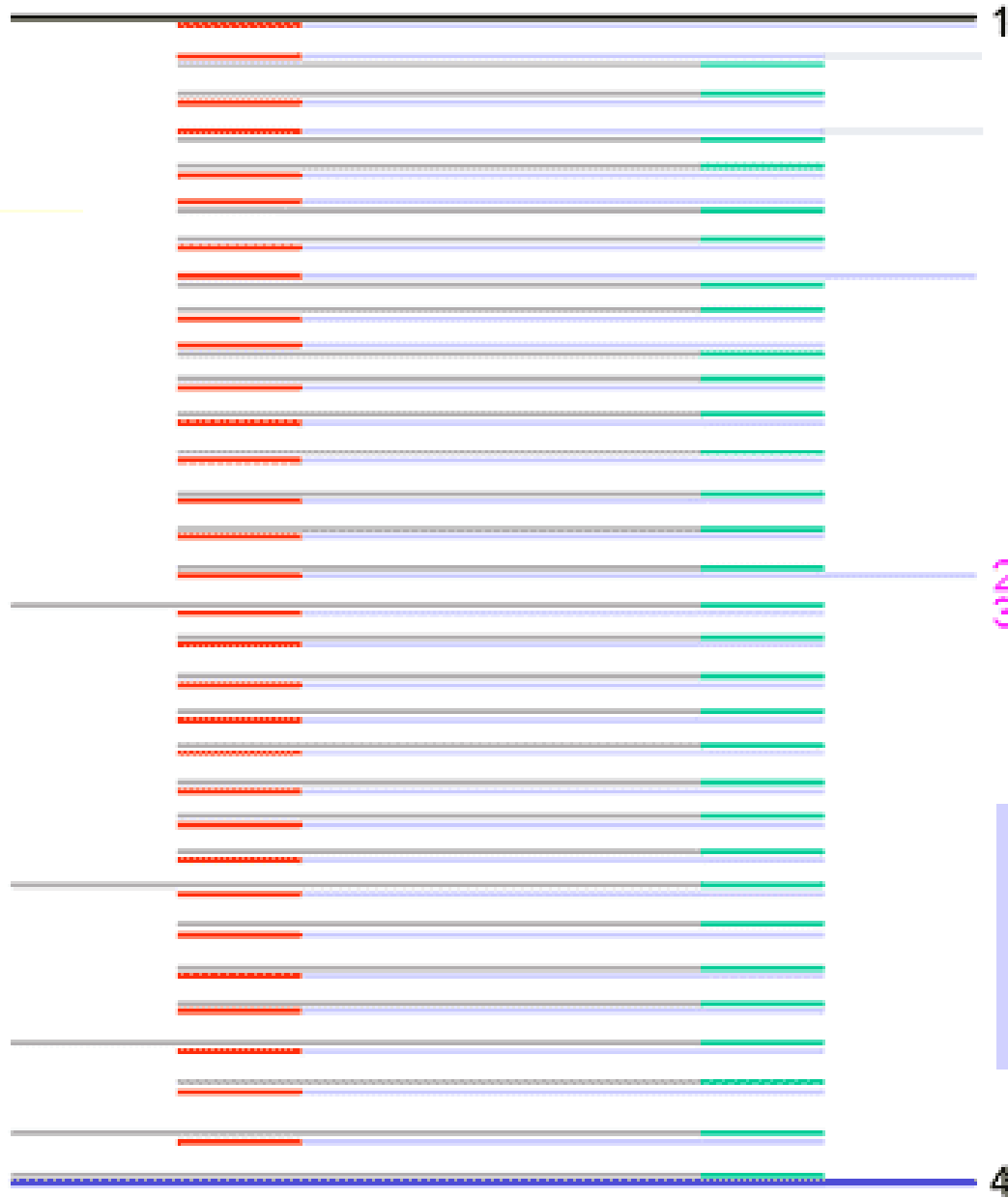
16 αντίγραφα – 32 αλυσίδες DNA:

2 μητρικές

8 νέες ακαθόριστου μήκους

22 νέες επιθυμητού μήκους





5^{ος} κύκλος:

32 αντίγραφα – 64 αλυσίδες DNA:

2 μητρικές

10 νέες ακαθόριστου μήκους

52 νέες επιθυμητού μήκους

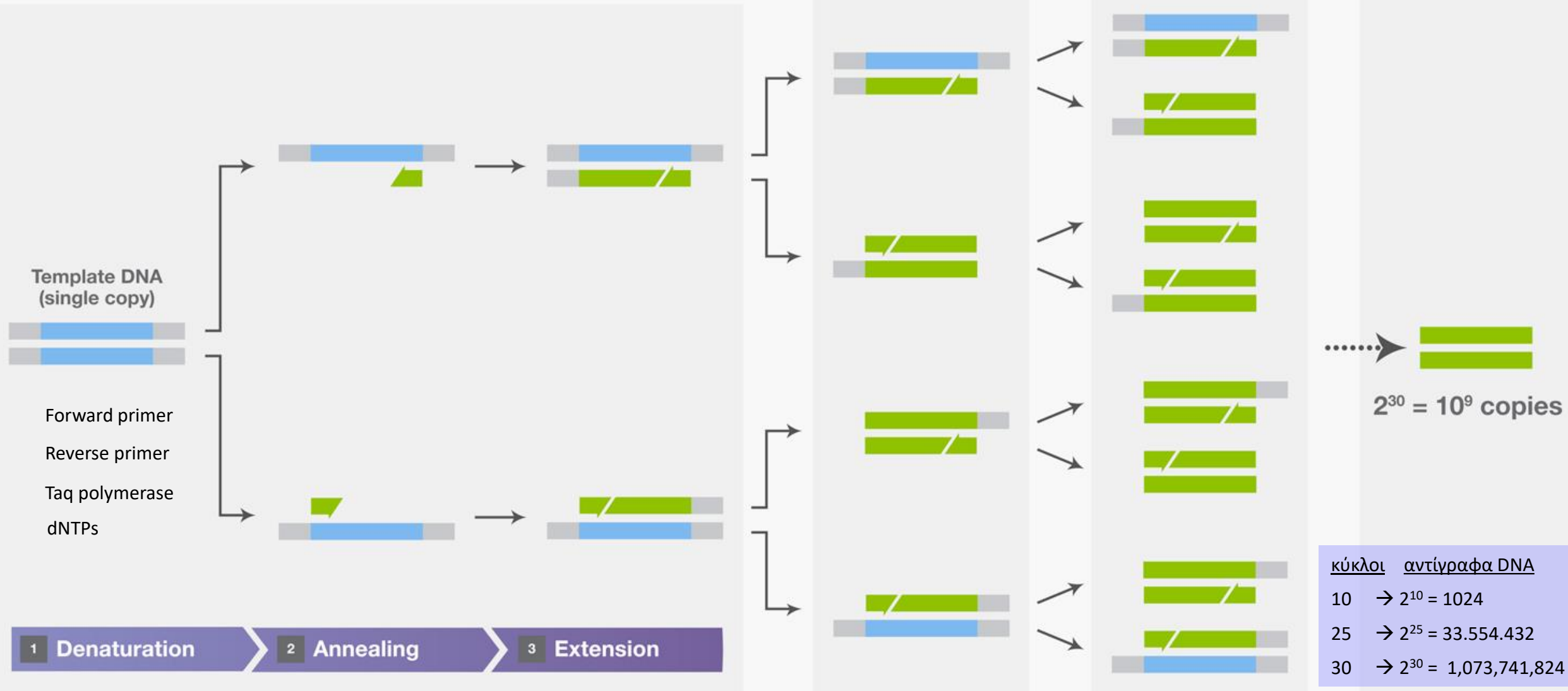
Μετά από:
 10 κύκλους → 1024 αντίγραφα DNA
 25 κύκλους → 33.554.432 αντίγραφα DNA

1st cycle

2nd cycle

3rd cycle

30th cycle



1 Denaturation 2 Annealing 3 Extension

2¹ = 2 copies

2² = 4 copies

2³ = 8 copies

.....
 2³⁰ = 10⁹ copies

κύκλοι	αντίγραφα DNA
10	→ 2 ¹⁰ = 1024
25	→ 2 ²⁵ = 33.554.432
30	→ 2 ³⁰ = 1,073,741,824

4 αλυσίδες
 2 μητρικές
 2 νέες ακαθόριστου μήκους

8 αλυσίδες
 2 μητρικές
 4 νέες ακαθόριστου μήκους
 2 νέες επιθυμητού μήκους

16 αλυσίδες
 2 μητρικές
 6 νέες ακαθόριστου μήκους
 8 νέες επιθυμητού μήκους

Συστατικά της αντίδρασης

DNA μήτρα (template): Οποιοδήποτε DNA (ολικό χρωμοσωμικό, μιτοχονδριακό, βακτηριακό, πλασμιδιακό) ή cDNA από οποιοδήποτε ιστό ή οργανισμό.

Καθαρότητα

Ποσότητα (π.χ. Mammalian DNA - 1 μ g, yeast DNA – 10 ng, bacterial DNA -1 ng, plasmid DNA -10 pg ανά αντίδραση)

Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers):

Βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις

Περιεκτικότητα σε βάσεις G, C 40-60%

Αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών μεταξύ των εκκινητών, ειδικά στο 3' άκρο

Αποφυγή δευτεροταγών δομών

Αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA

Απόρριψη των εκκινητών που έχουν ομολογία με ανεπιθύμητες περιοχές άνω του 70%

$Tm = (A+T) \times 2^{\circ}C + (G+C) \times 4^{\circ}C$ (< 14 bp) $Tm = 64.9 + 41 * (G+C-16.4) / (A+T+G+C)$ (>14 bp)

dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP σε τελική συγκέντρωση 200 μ M το καθένα.

MgCl₂: Ειδικότητα και απόδοση της αντίδρασης

Χαμηλή συγκέντρωση Mg²⁺ : αυστηρό κριτήριο - αυξάνει την ειδικότητα

Υψηλή συγκέντρωση Mg²⁺ : χαμηλό κριτήριο - αυξάνει την απόδοση

Συνήθως 0,5-5 mM

Προσδιορισμός άριστης συγκέντρωσης

DNA-πολυμεράση: Κατά κανόνα Taq DNA polymerase, 0.5-5 units

Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR buffer): 100 mM Tris-HCl pH 9 (25°C), 500 mM KCl και 1% μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100

Ειδικότητα PCR:

επιλογή κατάλληλων εκκινητών
χαμηλή συγκέντρωση Mg^{2+} , dNTPs, Taq, εκκινητών
χαμηλό αριθμό κύκλων
αυξημένη θερμοκρασία υβριδισμού

Μη ειδικό προϊόν PCR:

Μη ειδική σύνδεση εκκινητών
υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+}
χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού
πιθανότητα λάθους της πολυμεράσης (1 στα 10^9 nt *in vivo*, 2×10^4 nt *in vitro*)
επιμόλυνση από προηγούμενα προϊόντα PCR
(χρήση negative control – δείγμα με H_2O αντί για template)

συγκέντρωση Mg^{2+} - θερμοκρασία annealing



Υψηλό κριτήριο



Χαμηλό κριτήριο

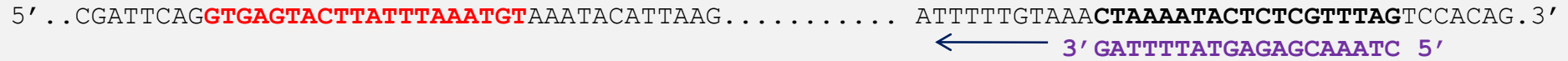
Σχεδιασμός της αντίδρασης

- Προσδιορισμός της περιοχής που θέλουμε να ενισχύσουμε
- Επιλογή εκκινητών F και R: σωστή αλληλουχία 5' → 3'
- Έλεγχος ειδικότητας
- Έλεγχος φυσικοχημικών ιδιοτήτων: T_m , hairpins, dimers
- Έλεγχος συνθηκών PCR: θερμοκρασία annealing, συγκέντρωση $MgCl_2$

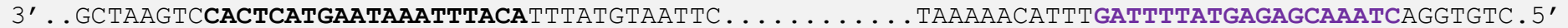


5' GTGAGTACTTATTTAAATGT 3'

3' GATTTTATGAGAGCAAATC 5'



5' GTGAGTACTTATTTAAATGT 3' →



5' **GTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAA**CTAAAATACTCTCGTTTAG** 3'
 3' **CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATC** 5'

Επιλογή και έλεγχος εκκινήτων

Παράδειγμα:

Ενίσχυση και απομόνωση τμήματος του μιτοχονδριακού DNA του δίθυρου μαλακίου *Mytilus galloprovincialis*. Το τμήμα που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί αντιστοιχεί στην κύρια ρυθμιστική περιοχή (CR) αντιγραφής και μεταγραφής του mtDNA.

CR-F: 5'-TGCCCTAGAGGCGTAGAAGCCTC-3' (23 nt)

CR-R: 5'-CTCTGACAAATGCTTATCAGCTG-3' (23 nt)

Γ^rRNAL

```
AAAGCATTAACATAAAAAGATACCCCTAAATGTTTTGTAAAAAGCGGGTCTAAACAAGGATAGTATAAAT
AAATTTTAGTACCTTTTGCATAAGGGTTTTTCAAGACAAATTTAAGTATTTAATTTTCCCGAATGAAAGA
GAGTTATTTTGTAGAGTTAAAAATCGTGGTAAAGATTTAATTTAAATTTAAAAATAGCGGCTAGATACTAT
TCGCGCTTTTAGATATCTGGTTGGCTTAGAAAATATGTGTAAGCATTACCCCTAAATACTTAAGGAGCAAA
TTCTTCGGGTAAAGCTGAAAAATGTTAAAAATTGACGCCAAGAAAAAAGTTGGTTTTTATAGGCTTTAGAC
TAGCCACTAAGCACAAATTTATTTTAACTAAAACCAAGTGGTGGAAAAAATTAATTTGGGGTCTGCATTTG
CTCTAAGATAAGCCTGTGGTCTGTAAGCAAAAAATATGATAAAAAACGAGTAAAGATATTTCTTTGGCTGG
TGTGACTCTACTGTTACACCTTAAAAAACTAACTGTGTTATAAGACTTTTTAAACGAACCTCGGCAACTA
AGCTTCTCGACTGTTTAAACAAAAACATTTCTTTTGATATGAGTAAAAGGTAGTCCCTGCCCTATGCAAC
TAAACTAACGTTTGTGTGTAATGGCGGCGTTAACGTGAGCGTCTTAAGGTAGCGCGATAATTTGCTTTTT
AATTTGAAGGATGGTATGAAAGGGTTAACGAAGAAGATGCTGTATCTAAAAATTTAATTTAACTAATTTT
AAGGTGAAGAGGCCTTAATGTAAGAAGGACGACAAGACCCTATGAAGCTTTATCTTAATTTGAAGGTCT
TAGCCTTTTATACGTTTTTGTAGGGAGATCAGCAAAAAATAAGTCTTTTGCTATAACATTAATCTTACTAG
AATTTACTAGTTTTTATATGTGTGACTAGCTACTCTAGGGATAACAGCGCAATTTCCCCCGAAAGATGGTA
```

16M-Sl-f (Forward)

```
TTGGAGGAGAAGATTGCGACCTCGATGTTGGCTTTAGGTGCCCTAGAGGCGTAGAAGCCTCTAAGGGTGG
GTCTGTTTCGCCCTTTAAAAATCTAACATGAGCTGAGTTTCAAGACGGCGTAAGCTAGTTTCAGTTTCTATCCT
CTTTTAAAAATGAGCTAATTTTGTACGAAAGGACTCTTTTCGCTAAAGTAATGCTTTTGGCCAGCCTTGTAT
```

Γ^{CR}_VD1

```
ATTACACAAATAATGTTACATGACGAGCTGAGTAACTCATAAAAAGGACTGCCTTTTATGTAAGTGAGGT
TGGCTACTAGACTTTACAGGAATATACGCAGATAGTTTACCTTGAAAAAGAGTGTGTATCGCGTATAT
GAAAGGCCTACCTGAACAACAGAGTAATCCCAGGGGAAAGAGGTGCGAGTCTCGTAAAAAATAGGAATAA
AGCTACCTAAAAAATATGGTGTGTAATGTGTGTATATAAGTATACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAACCGTAAAAATGTTTGGGAATAAGGTGTTTCTACACGCTTAGACTCCTTGCCATTGCCCTGTGACAGAAG
CAATCGCCTCAGTTCCCCTGTTTTTTTACACGTAAGAAGTCCCCTGTTGACGCACATGGGAGCCGCCTTAT
TAAATAACTTATAATATAAGTGAAGCACACCTAATTAGTTTTTATTAGGCATTTATAGTTTTATTCAA
```

Γ^{CR}_CD

```
ATTTAGGCCCATATGTCACAGATACCTAGCCATACCTCGTTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAGTAGA
```

MuDLR (Reverse)

```
TAAAGCTCTACAGCTGATAAGCATTGTGTCAGAGTCATGTGAGACTTACCCTAATTAGTAAAAAACAAGC
GGAAAATTTAAAGCCTCAAATCCTAGAGTTATCGAATTTTATAGTTAACTGTAAACTGTAAAAATGGGA
TTCGAAAGGTCTAATTTTCTCGTTTACTTAAATCTGGTTGCTCACGTGATTTACCTGGGTTTAAAAAC
TAGACTATATCTATCTTAAAAATCAGAATATATATAAATCAAGGTTAAAAAATTTCCCAAAGCGTAAA
```

Γ^{CR}_VD2

```
TTATCGGTTGTTCAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAATAAAAAAAGGAAAAAAGGTTACACACTAATG
```

Γ^Y

```
CCTGGGGGGGGCTGGACCTGGAGGGGAAAAAGGAGAACAACCCATAAGATGGCTGAGGAAAAGGCGGTG
AGCTGTAAACTCATAAACAAGGTTGGCCCTTTCTTATGA
```

>gi|34328764:16431-17671 Mytilus galloprovincialis haplotype M mitochondrion, rRNAL till tRNAY
AAAGCATTAACATAAAAAGATACCCCTAAATGTTTTGTA AAAAGCGGGCTAAACAAGGATAGTATAAAT
AAATTTAGTACCTTTTG CATAAGGGTTTTTCAAGACAAATTTAAGTATTTAATTTTCCCGAATGAAAGA
GAGTTATTTGTAGAGTTAAAAATCGTGGTAAAGATTTAATTA AATTTATAAAATAGCGGCTAGATACTAT
TCGCGCTTTAGATATCTGGTTGGCTTAGAAAATGTGTGAAGCATTACCCCTAAATACTTAAGGAGCAAA
TTCTTCGGGTTAAGCTGAAAAATGTTAAAATTGACGCCAAGAAAAAGTTGGTTTTTATAGGCTTTAGAC
TAGCCACTAAGCACAAATTTATTTAACTAAAACCAAGTGGTGAAAAAATTAATTGGGGTCGTCATTTG
CTCTAAGATAAGCCTGTGGTCGTAGAACCAAAAATTATGATAAAAACGAGTAAAGATATTCTTTGGCTGG
TGTGACTCTACTGTTACACCTTAAAAAATACTGTGTTATAAGACTTTTTAAACGAACCTCGGCAAACTA
AGCTTCTCGACTGTTTAAACAAAAACATTTCTTTTGATAGTAAAAGGTAGTCCCTGCCCTATGCAAC
TAAACTAACGTTTGTGTAATGGCGGCTTAACGTGAGCGTCTAAGGTAGCGGATAATTTGCTTTTT
AATTGAAGGATGGTATGAAAGGGTTAACGAAGAAGATGCTGTATCTAAAAATTTAATTTAAACTAATTT
AAGGTGAAGAGGCCCTAATGTAAAAGAAGGACGACAAGACCCTATGAAGCTTTATCTTAATTGAAGGTCT
TAGCCTTTTATACGTTTTTGATGGGAGATCAGCAAAAATAAGTCTTTTGTATAACATTAATCTTACTAG
AATTTACTAGTTTTATATGTGTGACTAGCTACTTAGGGATAACAGCGCAATTTCCCCGAAAGATGGTA
TTGGAGGAGAAGATTGCGACCTCGATTTGGCTTTAGGTG **CCCTAGAGGGCTAGAAGCCTCTAAG**GGTGG
GTCTGTTCCGCCCTTAAAATCTAACATGAGCTGAGTTCAGAACGGCGTAAGCTAGTTCAGTTCTATCCT
CTTTTAAAAATGAGCTAATTTGTACGAAAGGACTCTTTTCGCTAAAGTAATGCTTTGGCCGACCTTGTA
ATTACACAATAATGTTACATGACGAGCTGAGTAACTATAAAAAGGACTGCCTTTTATGTAAGTGAGGT
TGGCTACTAGACTTTACAGGAATATACGCAGATAGTTTACCTTGAAAAAGAGTGTGTATCGCGTATAT
GAAAGGCCTACCTGAACAACAGAGTAATCCCAGGGGAAAGAGGTGCGAGTCTCGTAAAAAATAGGAATAA
AGCTACCTAAAAAATATGGTGTGTAATGTGTATATAAGTATACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAACCGTAAAATGTTGGGAATAAGGTGTTCTACACGCTTAGACTCCTTGCCATTGCCTGTGACAGAAG
CAATCGCCTCAGTTCCTCGTTTTTTTACACGTA AAAAGTCCCTGTTGACGCACATGGGAGCCGCTTAT
TAAAATAACTTATAATATAAGTGAAGCACACCTAATTAGTTTTTATTAGGCATTTATAGTTTATTCAA
ATTTAGGCCATATGTCACAGATACCTAGCCATACCTCGTTTTAGATTATGCTCTATAGCCTGTAGTAGA
TAAAGCTCTAC **AGCTGATAAGCATTGTGAGAG**TCATGTGAGACTTACCCTAATTAGTAAAAAACAAGC
GGAAAATTTAAAGCCTCAAATCTAGAGTTATCGAATTTTTATAGTTAACTGTA AACTGTA AAAATGGGA
TTCGAAAGGTCTAATTTTTCTCGTTGACTTAATTCTGGTTGCTCACGTGATTACCTGGGTTTGAAAAAC
TAGACTATATCTATCTTAAAATCAGAATATATATAAATCAAGGTTTAAAAAATCCCAAAGCGTAAA
TTATCGGTTGTTCAAAGAAATAACTAATAAAGGCTAATAAAAAAAGGAAAAAAGGTTACACACTAATG
CCTGGGGGGGCTGGACCTGGAGGGGAAAAAGGAGAACAAACC **CATAAGATGGCTGAGGAAAAGCGGGTG**
AGCTGTA AACTATAACAAGGTTGGCCCTTTCTTATGA

16S rRNA

D-loop

tRNATyr

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligos-melting-temp.html>

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>



Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template

[Primers common for a group of sequences](#)

[Reset page](#)

[Save search parameters](#)

[Retrieve recent results](#)

[Publication](#)

[Tips for finding specific primers](#)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

```
>gi|34328764:16431-17671 Mytilus galloprovincialis haplotype M mitochondrion, rRNA
till tRNA
AAAGCATTAACTATAAAAGATACCCCTAAATGTTTTGTAAAAAGCGGGCTAAACAAGGATAGTATAAT
AAATTTTAGTACCTTTTGATAAGGGTTTTCAAGACAAATTTAAGTATTTTCCCGAATGAAAGA
GAGTTATTTGTAGAGTTAAAAATCGTGGTAAAGATTTAATTAATTATAAAATAGCGGCTAGATACTAT
```

Or, upload FASTA file

Choose File

No file chosen

Range [Clear](#)

From

To

Forward primer

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)



[Clear](#)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)



[Clear](#)

PCR product size

Min

Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min

Opt

Max

Max T_m difference



Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span



Exon junction match

Min 5' match

Min 3' match

Max 3' match

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check

Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template [?](#)

Search mode

Automatic [?](#)

Database

Custom [?](#)

Enter accession number, gi, or FASTA sequence [Clear](#)

AY363687.2

Or, upload file: No file chosen

Exclusion

Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences [?](#)

Organism

Mytilus galloprovincialis (taxid:29158)

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type. [?](#)

[Add more organisms](#)

Entrez query (optional)

[?](#)

Primer specificity stringency

Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including

at least mismatches within the last bps at the 3' end. [?](#)

Ignore targets that have or more mismatches to the primer. [?](#)

Max target size

[?](#)

Allow splice variants

Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) [?](#)

Show results in a new window Use new graphic view [?](#)

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

TGC CCT AGA GGC GTA GAA GCC TC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

GAG GCT TCT ACG CCT CTA GGG CA

5' modification (if any)

3' modification (if any)

Select molecule

nM Primer

Measured Absorbance at 260 nanometers

mM Salt (Na⁺)

Calculate

Swap Strands

BLAST

mfold

Physical Constants

Length: Molecular Weight: GC content: %

1 ml of a sol'n with an Absorbance of at 260 nm

is microMolar and contains micrograms.

Melting Temperature (T_M) Calculations

°C (Basic)

°C (Salt Adjusted)

°C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK cal/(°K*mol)

deltaH Kcal/mol

deltaG Kcal/mol

deltaS cal/(°K*mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

(Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)

(Minimum base pairs required for a hairpin)

Check Self-Complementarity

CR-F: 5'-TGCCCTAGAGGCGTAGAAGCCTC -3' (23 nt)

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

CTC TGA GAA ATG CTT ATC AGC TG

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CAG CTG ATA AGC ATT TCT CAG AG

5' modification (if any)

3' modification (if any)

Select molecule

ssDNA

50 nM Primer

50 mM Salt (Na⁺)

1 Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate

Swap Strands

BLAST

mfold

Physical Constants

Length: Molecular Weight: GC content: %

1 ml of a sol'n with an Absorbance of at 260 nm

is microMolar and contains micrograms.

Melting Temperature (T_M) Calculations

1 °C (Basic)

2 °C (Salt Adjusted)

3 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK cal/(°K**mol*)

deltaH Kcal/*mol*

deltaG Kcal/*mol*

deltaS cal/(°K**mol*)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

(Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)

(Minimum base pairs required for a hairpin)

Check Self-Complementarity

Citation: Kibbe WA. 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. (2007)
Nucleic Acids Res. **35**(webserver issue): May 25. ([Abstract/Full text](#))

This page may be freely linked or distributed for any educational or non-commercial use.

CR-R: 5'-CTCTGAGAAATGCTTATCAGCTG-3' (23 nt)

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

5' CTCTGAGAAATGCTTATCAGCTG 3'

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

5' CTCTGAGAAATGCTTATCAGCTG 3'
3' GTCGACTATTCGTAAGAGTCTC 5'

5' CTCTGAGAAATGCTTATCAGCTG 3'
3' GTCGACTATTCGTAAGAGTCTC 5'

Προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης MgCl₂ για την ενίσχυση με PCR του παραπάνω τμήματος DNA

Συγκεντρώσεις MgCl₂ :

0.5 mM
1 mM
1,5 mM
2 mM
2,5 mM
3 mM

Δείγματα:

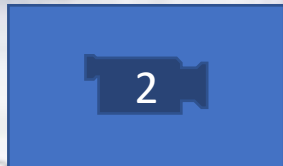
- 1) T (αρνητικό control)
- 2) 0.5
- 3) 1
- 4) 1.5
- 5) 2
- 6) 2.5
- 7) 3

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση ή ποσότητα στην αντίδραση	Ποσότητα που απαιτείται για όγκο 50 μl
PCR buffer	10X	1X	
dNTPs	2 mM	200 μM	
Primer F	5 μM	25 pmoles	
Primer R	5 μM	25 pmoles	
Taq pol	1 unit/μl	0,5 unit	
MgCl ₂	25 mM	0,5 - 3 mM	
DNA	20 ng/μl	50 ng	
H ₂ O			

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94	3 min
Αποδιάταξη	94	30 sec
Αναδιάταξη	56	30 sec
Επιμήκυνση	72	40 sec
Τελική επιμήκυνση	72	5 min



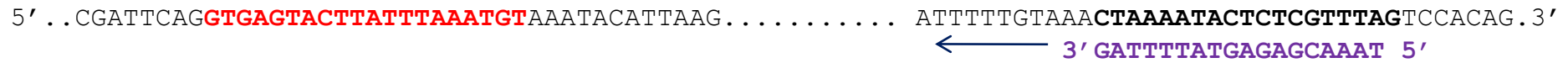
30 κύκλοι



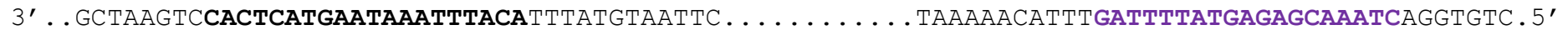


5' GTGAGTACTTATTTAAATGT 3'

3' GATTTTATGAGAGCAAAT 5'



5' GTGAGTACTTATTTAAATGT 3' →



5' **GTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAA**CTAAAATACTCTCGTTTAG** 3'

3' **CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATC** 5'

Forward

5' ..CGATTCAG**GTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAAC**CTAAAATACTCTCGTTTAG**TCCACAG.3'
 3' ..GCTAAGTCC**CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATC**AGGTGTC.5'

Reverse

5' **NNCTGCAGGTGAGTACTTATTTAAATGT** 3'

Pst I: 5' CTGCAG 3'
3' GACGTC 5'

3' **GATTTTATGAGAGCAAATCGACGTCNN** 5'

5' ..CGATTCAG**GTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAAC**CTAAAATACTCTCGTTTAG**TCCACAG.3'
 3' ..GCTAAGTCC**CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATC***GACGTCNN* 5'

5' NNCTGCAG **GTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAAC**CTAAAATACTCTCGTTTAG**TCCACAG.3'
 3' ..GCTAAGTCC**CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATC**AGGTGTC.5'

5' **NNCTGCAGGTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAAC**CTAAAATACTCTCGTTTAG**TCCACAG.3'
 3' **NNGACGTC**CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC**..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATC***GACGTCNN* 5'

5' NNCTGCAG **GTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAAC**CTAAAATACTCTCGTTTAG****CTGCAGNN** 3'
 3' ..GCTAAGTCC**CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATCGACGTCNN** 5'

5' **NNCTGCAGGTGAGTACTTATTTAAATGT**AAATACATTAAG..... ATTTTGTAAAC**CTAAAATACTCTCGTTTAGCTGCAGNN** 3'
 3' **NNGACGTC**CACTCATGAATAAATTTACA**TTTATGTAATTC**..... TAAAAACATTT**GATTTTATGAGAGCAAATCGACGTCNN** 5'

5' NNCTGCAGGTGAGTACTTATTTAAATGTAATACATTAAG..... ATTTTGTAAACTAAAATACTCTCGTTTAGCTGCAGNN 3'
3' NNGACGTCCTCATGAATAAATTTACATTTATGTAATTC..... TAAAAACATTTGATTTTATGAGAGCAAATCGACGTCNN 5'

Πέψη με Pst I

5' GGTGAGTACTTATTTAAATGTAATACATTAAG..... ATTTTGTAAACTAAAATACTCTCGTTTAGCTGCA 3'
3' ACGTCCACTCATGAATAAATTTACATTTATGTAATTC..... TAAAAACATTTGATTTTATGAGAGCAAATCG 5'

(A)

Να υπολογίσετε για κάθε συστατικό την ποσότητα (σε μl) που απαιτείται για να έχει σε μια αντίδραση PCR τελικού όγκου 50 μl την τελική συγκέντρωση που φαίνεται στην 3^η στήλη

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση στην αντίδραση	Ποσότητα που απαιτείται για όγκο 50 μl
PCR buffer	10x	1x	
dNTPs	10 mM	500 μM	
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM	
Primer F	10 pmoles/ μl	0,5 μM	
Primer R	10 pmoles/ μl	0,5 μM	
Template DNA	10 ng/ μl	30 ng	
Taq pol	5 unit/ μl	2 units	
H ₂ O			

(B)

Να σχεδιαστούν 2 εκκινητές F και R που να στοχεύουν στην ενίσχυση αποκλειστικά και μόνο του **INTRON**

Exon 1: <313..363
Intron: 364..1737
Exon 2: 1738..>2196

```

1 gaattccata ttgtctataa ttctaaaatt aatcattttt acaaccagcg aacttcaaaa
61 tagagaatgt ctaaagtaac tcatcaaatt caaaatataa aataaaatag aaattcaata
121 ataactgagg ctttagttct aaatcacata tctgtgttta cgtaattatt actgaaatta
181 cctaattgatt ttatataaag ggacatagtt tctagtttgt cacgtaatag agatagcggg
241 tggcaacaaa actatataaa aacagaaatt tggtagttga aagagtatac aagtatacct
301 cagtaaaaca acatggcagc caagattatt ctcttcttgt ccgatctgc tctcgcgggt
361 caggtgagta cttatttaaa tgtaaatata ttaagatttt ttaatttctt atatgacgag
421 cccatgatcc tatatccaca tttcagcttt atatatatac ccattttggg atagtatact
481 catagatatg tctataataa tgttactggg aaggtcgatc tttgccgcca cccaccttga
541 gatataagtt ctaaggcttc agtatagtta caacggcttg cacctcgtcg ccacaggggg
601 agccgacgcc gaagtgccac actgcagttg ctgcaacgag gacacggcgg agcacacgct
661 cgcgtactgc cccgctttcg cggagcagcg ccgggtcctc gttgcaaaaa taggacogga
721 cttgtcgctt ccaaccgtcg tggctacgat gctcgacagc gacgagtcct ggcaggcgat
781 gctcgatttc tgcgagttca ccatctcgca gaaggaggcg gcggaacggg agagggagag
841 ctcttcttcc ctctcggcgc cgtgccgccc cccgtcgagc cgggggtcgg aggagggcgt
901 ttgtccagct cccgccccta tgaggaggca gtctcttccc cctgggtaag gtcacggggc
961 gacctgaggc tgcgccgat gctaccgtca ctttagcgcg ctggcaccag gaggacggga
1021 cgacgcgttg gccgctgcgg actgcaatgc ggtccgcatt tctcgtcggc ctgtcatcgc
1081 cgaatatact gtggaagcgc aaccggctcg gcggtgtatc gcgttccgan ccggcaggct
1141 ggttctggcc cagcggggta tcctggtaca ccagcggcat cgcctggggc gtctgatagg
1201 gccgccgtac cgcggagacc gatgtcgttg gtcgtcgact atcgcctcga cggcccctcg
1261 gtcgggcac ctcgggggtg cgcgcgctgt ctggtttag tagttgaccgc tggaaacccc
1321 catactctga cggggtttg accccggagc gagatcggac gtcgggtgta agagtgcagg
1381 ggagtcgttt agtgggtgga ccctagaatc cttgggcccg cggctctgctc acaacaccat
1441 gcagatcgtt gagtctcaca tacaccgccg ccgcctctta tgcgcgggga cctcgtagga
1501 ggttcggccc aggcccgaaa aaaaaattg ttacaacggc tgtcccacc ttaaaccoga
1561 aacgcattac tgcttcacgg ctgtactgta ttataacaaa agcaatccaa caaaaacaaa
1621 acgttcgact taaaagtaca aggtgcggta attattagct aatacagagta taggtttaa
1681 aaataaataa ataaataaat aaaagtgatt tttgtaaact aaaatactct cgtttagtc
1741 acagttggcc agtacatcgg ccgcgtgaac aatggttgtg gatgcccggaa tctcaactac
1801 cgtggcctcg gttacaccgc tggctgtggg ctactgctg ctagtctctc tgcagcctcc
1861 cacggaggag ggttattcgt cgtcacctcc tctgccacgc ctactggtct cggcatagct
1921 tccgagaaca gatacgaagg cgtgtcgtat gttgtcggca agattccatt cctgggcacc
1981 gctgatgtcg caggcgagtt cccactgcg ggcattgggt agatcaacta cagctgccc
2041 gatggagcag tcgccattac cgctgaaggt ggtctcggct acgctggagg acttgactac
2101 actggtgagc tcggctacgc gagtggactt ggctacggct taggctatgg agaatacgtt
2161 ggatgcggtt gtggttgccg tgacgtctac ttgtagaaca tgataatgat gataaaataa
2221 acttataagt tcgaataaac tctggtaaac atgaaagtct ggtatttatt tccgagtaat
2281 tcccattttg caccagctta gtttattcgc atcgcaatac agtattttga gtgagggcct
2341 ttgtaagtgt ggcgttttca tgcggcctga agtcacatta agaaccttca catcacacaa
2401 tcccattttt attggaaaac cgtcggagtg ccacggtttg taaagaatgt agtcattttg
2461 gtaattagga attc

```

(a)
Intron forward primer:
5'.....3'

Intron Reverse primer:
5'.....3'

Μήκος προϊόντος PCR:

(b)
Intron forward primer:
5'NNGAATTC.....3'

Intron Reverse primer:
5'NNGAATTC.....3'

Μήκος προϊόντος PCR: