

RSALIND Quest

Руководители:
Михаил Райко
Николай Вяххи

Студент:
Олег Магнес

Polymerase Chain Reaction

-> Последовательность ДНК (400-600 bp), границы фрагмента, температура плавления

[... 5 минут ...]

<- Праймеры, которыми можно было бы амплифицировать заданный фрагмент, с температурой плавления отличающейся от данной не более, чем на два градуса.

Цель: ознакомление пользователя с принципом работы ПЦР

Primer3

Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence.

[disclaimer](#) [code](#)
[cautions](#)

Select the [Task](#) for primer selection

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINES, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#)

```
AACAATCGGTGATTCAAGAGGTCATGGGGCGATGCCGCCACATTCATCGTCCAGCGTTTGGTCATACTCGTAACAGATAGCCTAATCCCTTGGGC  
GTTTAGCCCCATCCTATGTTAGATTTCTGCCTACAGTA
```

<input checked="" type="checkbox"/> Pick left primer, or use left primer below	<input type="checkbox"/> Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below	<input checked="" type="checkbox"/> Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

- [Sequence Id](#) A string to identify your output.
- [Targets](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.
- [Overlap Junction List](#) E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the [source sequence](#) with -: e.g. ...ATCTAC-TGTCAT.. means that primers must overlap the junction between the C and T.
- [Excluded Regions](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.
- [Pair OK Region List](#) See manual for help.
- [Included Region](#) E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base region starting at position 20. Or use { and } in the [source sequence](#) to mark the beginning and end of the included region: e.g. in ATC{TTC...TCT}AT the included region is TTC...TCT.
- [Start Codon Position](#)
- [Internal Oligo Excluded Region](#)
- [Force Left Primer Start](#) [Force Right Primer Start](#)
- [Force Left Primer End](#) [Force Right Primer End](#)

NCBI Primer-BLAST

www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Primer-BLAST *A tool for finding specific primers*

NCBI Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). [More...](#) [Tips for finding specific primers](#)

PCR Template

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#)

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

Or, upload FASTA file

Выберите файл

Range

	From	To	
Forward primer	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Clear
Reverse primer	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

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
<input type="text" value="70"/>	<input type="text" value="1000"/>

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min	Opt	Max	Max T _m difference
<input type="text" value="57.0"/>	<input type="text" value="60.0"/>	<input type="text" value="63.0"/>	<input type="text" value="3"/> Clear

Exon/intron selection

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

Exon junction span

 [Clear](#)

Exon junction match

Exon at 5' side	Exon at 3' side
<input type="text" value="7"/>	<input type="text" value="4"/>

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [Clear](#)

Intron Inclusion

 Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [Clear](#)

Intron length range

Min	Max
<input type="text" value="1000"/>	<input type="text" value="1000000"/> Clear

Electronic PCR

-> праймеры

[... 5 минут ...]

<- размер фрагмента, который теоретически может получиться, если сделать ПЦР с данными праймерам на геноме человека

Цель: ознакомление пользователя с системами PCR in silico.

NCBI Electronic PCR

Electronic PCR (e-PCR)

Forward e-PCR

Search STS database
with sequence

Reverse e-PCR

Search sequence database
with STS

What is e-PCR?

e-PCR identifies sequence tagged sites (STSs) within DNA sequences. Using e-PCR, you can search for sub-sequences that closely match the PCR primers and have the correct order, orientation, and spacing.

What's New?

Improved search sensitivity

You can use multiple discontinuous words instead of a single exact word. Each of these words has groups of significant positions separated by 'wildcard' positions. It is not required that these positions match. Also, it is now possible to allow gaps in the primer alignments. A fuzzy matching strategy reduces the likelihood that a true STS will be missed due to mismatches.

Reverse searching

Searching the human genome sequence and other large genomes is now possible. The new version of e-PCR provides a search mode using a query sequence against a sequence database.

Publications

[Sequence mapping by electronic PCR](#)

Schuler GD. Genome Res. 1997 May;7(5):541-50.

[A web server for performing electronic PCR](#)

Rotmistrovsky K, Jang W, Schuler GD. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W108-12.

PCR Primer Design: цели и задачи

-> название болезни/синдрома

[... 30 минут ...]

<- набор из F/R праймеров, которые можно было бы использовать для ПЦР-анализа пациента с подозрением на эту болезнь

Пользователь должен ознакомиться с информацией про болезнь, найти в каком гене может быть причина, какой для этой болезни характерен тип мутаций и в какой части гена следует её искать. После чего найти последовательность гена, найти мутацию, сделать *качественные* праймеры.

PCR Primer Design: праймеры

- амплифицируют именно тот участок гена, где мутация :)
- определённая длина праймера (16-23 нуклеотида)
- определённая длина ПЦР-продукта
- температуры отжига максимум отличаются на $\pm 2^{\circ}\text{C}$
- не более 3 G/C на 3' конце
- не образуют димеры между собой
- допускается неполная комплементарность к ДНК мишени (до 2 нуклеотидов)

Спасибо за внимание!