

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 3.

Reakcja odwrotnej transkrypcji.

Projektowanie starterów do reakcji PCR.

Zadanie 1. Reakcja odwrotnej transkrypcji.

WAŻNE! Dla większej wydajności reakcji rekomendowane jest jej przeprowadzenie w obecności inhibitorów RNaz. Wszystkie odczynniki i plastiki muszą być wolne od tych enzymów. Wszystkie czynności powinny być wykonywane w bezpudrowych rękawiczkach. Pamiętaj o każdorazowej wymianie końcówek przy odpipetowywaniu nowego odczynnika (zapobieganie kontaminacji).

1. Do sterylnej, podpisanej probówki o pojemności **0,2 ml** dodaj odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli nr 1 (kolejność również istotna) dla próbki **RT**. Jeden zespół na grupę, wskazany przez prowadzącego, przygotowuje reakcję kontrolną- kontrola negatywna (NC). Wszystkie czynności wykonuj, trzymając probówkę cały czas na lodzie.

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka RT	Próbka NC
Woda (DEPC)	-	9 µl	14 µl
5xNG cDNA Buffer	1x	4 µl	4 µl
Startery (primers)	2,5 µM oligo(dT) ₂₀ lub 10 ng/ml RH (sprawdź co masz na stole!)	1 µl	1 µl
RNA	≈5 µg	5 µl	-
NG dART RT mix		1 µl	1 µl

Objętość końcowa reakcji 20 µl

5x NG cDNA Buffer zawiera optymalny dla enzymu bufor RT oraz mieszaninę DTP

NG dART RT mix zawiera odwrotną transkryptazę dART, mieszaninę dNTPs oraz inhibitor hamujący aktywność RNazy A, B i C

2. Po dodaniu wszystkich składników zawartość probówki delikatnie wymieszaj (pipetowanie) i zwiń, tak aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieść probówkę w lodzie.

3. Zaprogramuj termocykler na następujący profil termiczny

60 minut- 50°C dla starterów oligo(dT)₂₀ (w przypadku użycia RH: 25°C przez 10min, 50°C przez 50 min.)

5 minut- 85°C

4°C- ∞

4. Umieść probówkę w termocyklerze i rozpocznij reakcję.

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

5. Po zakończeniu reakcji próbkę oddaj do pokoju przygotowawczego w celu jej przechowania do następnych ćwiczeń. cDNA przechowywać w -20°C . Unikać rozmrażania/zamrażania materiału. cDNA otrzymane w reakcji RT będzie stanowiło matrycę w PCR zaplanowanej na kolejnych zajęciach. **Proszę o dokładne opisanie swoich prób celem szybkiej identyfikacji na kolejnych zajęciach!**

Przepisz sekwencję RNA

5'ccugauuuuaaaggcccuuaggaacuuaugcccuuugcgcggaugugacaugggaauccuauuuu3'

tak jakby to zrobiła odwrotna transkryptaza. Jako startera do reakcji użyto oligonukleotydu:

5'ggattcccatgtca.....

Uzupełnij zdania:

W reakcji RT stosowane są(ile) różne typy sekwencji starterowych. Startery służą do przepisywania specyficznych fragmentów RNA. Startery losowe (Random) wykorzystuje się do przepisywania zarówno cząsteczek jak i Do tworzenia bibliotek cDNA, powstających z przepisywania wszystkich cząsteczek mRNA znajdujących się w danym momencie w komórce, służą startery.....

Do usuwania nici RNA po reakcji odwrotnej transkrypcji stosuje się enzym

Zadanie 2. Projektowanie starterów do PCR.

Na podstawie sekwencji kodującej 5'-ctagggtattggctagcgcgcgcatgctgtgattagcctagcctaaaggtt-3' zapisz:

Sekwencję matrycową.....

Sekwencję startera sens (FORWARD) obejmującego 15 pierwszych nukleotydów

5'-.....

Sekwencję startera antysens (REVERSE) składającą się z 15 ostatnich nukleotydów

5'-.....

Oblicz temperaturę topnienia obu starterów, korzystając z algorytmu $T_m=4x(G+C)+2x(A+T)$

Sens....., antysens

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Wśród podanych niżej oligonukleotydów wskaż te, które będą tworzyły struktury spinki do włosów lub homodiemery. Narysuj te struktury:

- A. 5'-actttccgctaaggaaagactact
- B. 5'-accttggccttggtgttttttgttt
- C. 5'-aaaacacctggggttttcccagg

PROJEKT: KLONOWANIE SEKWENCJI KODUJĄCEJ INF γ DO WEKTORA pcDNA3

Na podstawie sekwencji NM_000619.2 ([CDS 127..627](#), przedstawiającej cDNA kodujące interferon gamma, zaprojektuj startery (sens i antysens) umożliwiające na namnożenie sekwencji w PCR a następnie wklonowanie produktu PCR do wektora pcDNA3.

```
1 cacattgttc tgatcatctg aagatcagct attagaagag aaagatcagt taagtccttt
  61 ggacctgatac agcttgatac aagaactact gatttcaact tctttggcctt aattctctcg
 121 gaaacgatga aatatacaag ttatatcttg gcttttcagc tctgcatcgt tttgggttct
 181 cttggctggt actgccagga cccatatgta aaagaagcag aaaaccttaa gaaatatttt
 241 aatgcaggtc attcagatgt agcggataat ggaactcttt tcttaggcat tttgaagaat
 301 tggaaagagg agagtgacag aaaaataatg cagagccaaa ttgtctcctt ttacttcaaa
 361 ctttttaaaa actttaaaga tgaccagagc atccaaaaga gtgtggagac catcaaggaa
 421 gacatgaatg tcaagttttt caatagcaac aaaaagaaac gagatgactt cgaaaagctg
 481 actaattatt cgtaactga cttgaatgtc caacgcaaag caatacatga actcatccaa
 541 gtgatggctg aactgtcgcc agcagctaaa acagggagc gaaaaaggag tcagatgctg
 601 tttcgaggtc gaagagcadc ccagtaatgg ttgtcctgcc tgcaatattt gaattttaaa
 661 tctaaatcta tttattaata tttaacatta tttatatggg gaatatattt ttagactcat
 721 caatcaaata agtatttata atagcaactt ttgtgtaatg aaaaatgaata tctattaata
 781 tatgtattat ttataattcc tatatcctgt gactgtctca cttaatcctt tgttttctga
 841 ctaattaggc aaggctatgt gattacaagg ctttatctca ggggccaact aggcagccaa
 901 cctaagcaag atcccatggg ttgtgtggtt atttcacttg atgatacaat gaacacttat
 961 aagtgaagtg atactatoca gttactgccg gtttgaaaat atgcctgcaa tctgagccag
1021 tgctttaatg gcatgtcaga cagaacttga atgtgtcagg tgaccctgat gaaaacatag
1081 catctcagga gatttcatgc ctgggtgcttc caaatattgt tgacaactgt gactgtaccc
1141 aatggaaag taactcattt gttaaaatta tcaatatcta atatatatga ataaagtgta
1201 agttcacaac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

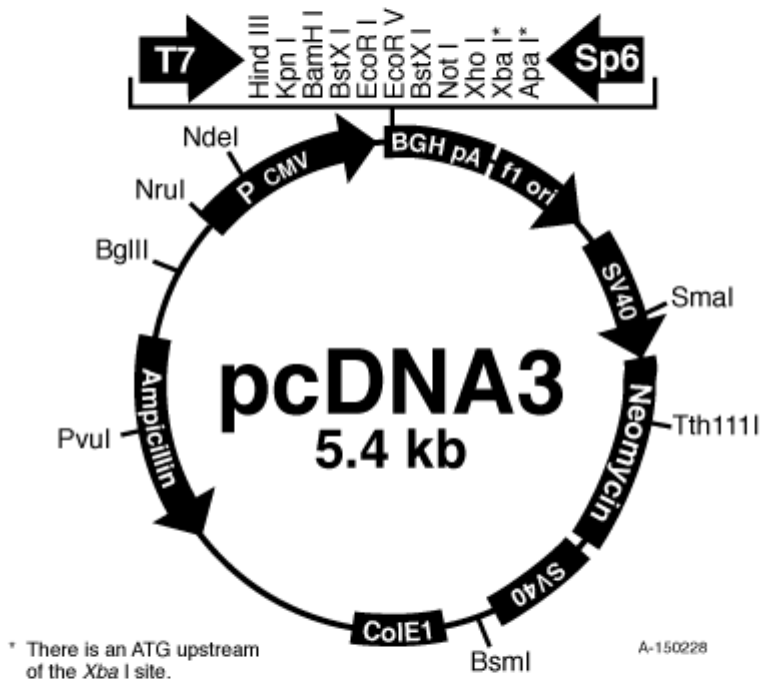
Lista endonukleaz restrykcyjnych, które nie tną sekwencji, znajduje się poniżej

1 AatII G ACGT C 2 Acc65I G GTAC C 3 AccI GT MK AC 4 AclI AA CG TT 5 AfeI AGC GCT 6 AflIII A CRYG T 7 AgeI A CCGG T 8 AhdI GACNN N NNGTC 9 AleI CACNN NNGTG 10 ApaI G GGCC C 11 ApaLI G TGCA C 12 AscI GG CGCG CC 13 AsiSI GCG AT CGC 14 AvaI C YCGR G 15 AvrII C CTAG G 16 BaeGI G KGCM C 17 BaeI (N)₅ (N)₁₀ACNNNNGTAYC (N)₇ (N)₅ 18 BamHI G GATC C 19 BanI G GYRC C 20 BanII G RGCY C 21 BbvCI CC TCA GC 22 BceAI ACGGC (N)₁₂ NN 23 BcgI NN (N)₁₀CGA (N)₆TGC (N)₁₀ NN 24 BciVI GTATCC (N)₅ N 25 BglIII A GATC T 26 BlpI GC TNA GC 27 BmgBI CAC GTC 28 BmtI G CTAG C 29 BpmI CTGGAG (N)₁₄ NN 30 BpuEI CTGAG (N)₁₄ NN 31 BsaAI YAC GTR 32 BsaBI GATNN NNATC 33 BsaHI GR CG YC 34 BsaWI W CCGG W 35 BsaXI NNN (N)₉AC (N)₅CTCC (N)₇ NNN 36 BseYI C CCAG C 37 BsgI GTGCAG (N)₁₄ NN 38 BsiEI CG RY CG 39 BsiHKAI G WGCW C 40 BsiWI C GTAC G 41 BsmBI CGTCTCN NNNN 42 BsmFI GGGAC (N)₁₀ NNNN 43 BsmI GAATG CN 44 BsoBI C YCGR G 45 Bsp1286I G DGCH C 46 BspDI AT CG AT 47 BspEI T CCGG A 48 BspHI T CATG A 49 BsrBI CCG CTC 50 BsrDI GCAATG NN 51 BsrGI T GTAC A 52 BssHII G CGCG C 53 BsssI C ACGA G 54 BstAPI GCAN NNN NTGC 55 BstUI CG CG 56 BstXI CCAN NNNN NTGG 57 BstZ17I GTA TAC 58 Bsu36I CC TNA GG 59 BtgZI GCGATG (N)₁₀ NNNN 60 BtsI GCAGTG NN 61 Clai AT CG AT 62 CspCI NN (N)₁₁CAA (N)₅GTGG (N)₁₀ NN 63 DraIII CAC NNN GTG 64 EaeI Y GGCC R 65 EagI C GGCC G 66 EciI GGCGA (N)₉ NN 67 Eco53kI GAG CTC 68 EcoNI CCTNN N NNAGG 69 EcoRI G AATT C 70 EcoRV GAT ATC 71 Esp3I CGTCTCN NNNN 72 FauI CCCGCNNNN NN 73 FseI GG CCGG CC 74 Fspi TGC GCA 75 HaeII R GCGC Y 76 HgaI GACGC (N)₅ (N)₅ 77 HhaI G CG C 78 HinPII G CG C 79 HindIII A AGCT T 80 HpaI GTT AAC 81 Hpy99I CGWCG 82 HpyAV CCTTC (N)₅ N 83 HpyCH4IV A CG T 84 KasI G GCGC C 85 KpnI G GTAC C 86 MfeI C AATT G 87 MluI A CGCG T 88 MscI TGG CCA 89 MspAII CMG CKG 90 NaeI GCC GCC 91 NarI GG CG CC 92 NciI CC S GG 93 NgoMIV G CCGG C 94 NheI G CTAG C 95 NmeAIII GCCGAG (N)₁₉ NN 96 NotI GC GGCC GC 97 NruI TCG CGA 98 NsiI A TGCA T 99 PacI TTA AT TAA 100 PaeR7I C TCGA G 101 PciI A CATG T 102 PflFI GACN N NGTC 103 PluTI G GCGC C 104 PmeI GTTT AAAC 105 PmlI CAC GTG 106 PshAI GACNN NNGTC 107 PspOMI G GGCC C 108 PspXI VC TCGA GB 109 PstI C TGCA G 110 PvuI CG AT CG 111 PvuII CAG CTG 112 RsrII CG GWC CG 113 SacI G AGCT C 114 SacII CC GC GG 115 Sali G TCGA C 116 SbfI CC TGCA GG 117 ScaI AGT ACT 118 SexAI A CCWGG T 119 SfcI C TRYA G 120 SfiI GGCCN NNN NGCC 121 SfoI GGC GCC 122 SgrAI CR CCGG YG 123 SmaI CCC GGG 124 SnaBI TAC GTA 125 SpeI A CTAG T 126 SphI G CATG C 127 SrfI GCCC GGGC 128 StuI AGG CCT 129 SwaI ATTT AAAT 130 TfiI G AWT C 131 TspMI C CCGG G 132 Tth111I GACN N NGTC 133 XbaI T CTAG A 134 XhoI C TCGA G 135 XmaI C CCGG G 136 XmnI GAANN NNTTC 137 ZraI GAC GTC

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



The sequence of pcDNA3 has been compiled from information in sequence databases, published sequences, and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in the sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department at 800-955-6288.

U.S. Headquarters

Tel: 1-800-955-6288
Fax: 1-760-603-7201

European Headquarters

Tel: +31 (0) 594 515 175
Fax: +31 (0) 594 515 312

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Wybrane miejsca klonowania do wektora
(wpisz nazwy enzymów restrykcyjnych)

Sekwencja startera sens:

5'

Temperatura topnienia startera sens:

pozycja pz sekwencji wykorzystanej do przygotowania startera sens:
.....

Możliwe struktury drugorzędowe i niespecyficzna hybrydyzacja (wpisz tak/nie, jeśli tak narysuj przykłady).....

Sekwencja startera antysens:

5'

Temperatura topnienia startera antysens:

pozycja pz sekwencji wykorzystanej do przygotowania startera antysens:
.....

Możliwe struktury drugorzędowe i niespecyficzna hybrydyzacja (j.w.)
.....