

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 3.

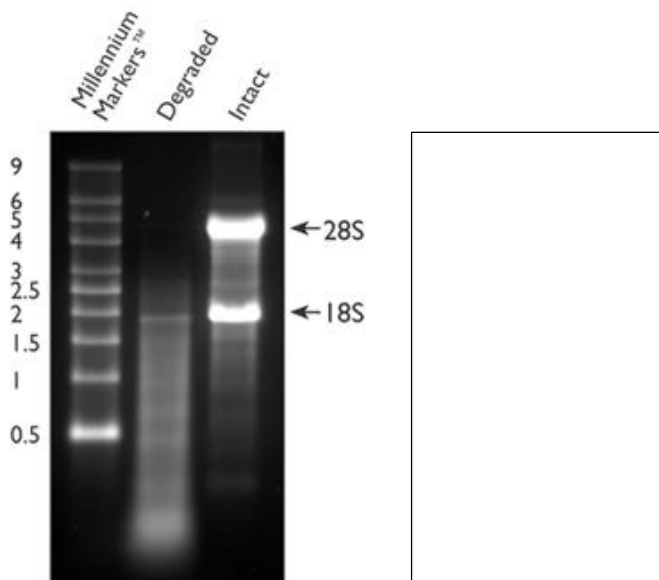
1. Elektroforeza cząsteczek RNA.
2. PCR jakościowy.
3. Bioinformatyka. Bazy danych.
4. Projektowanie starterów do PCR.

Zadanie 1. Elektroforeza RNA.

UWAGA! Ze względu na obecność RNaz w środowisku należy wszystkie czynności prowadzić na odczynnikach traktowanych inhibitorami dla tych enzymów.

W tym celu aparat do elektroforezy, grzebień i saneczki należy zalać 0,1M roztworem NaOH na 0,5 godziny lub 0,1% roztworem DEPC (dietylopirowęglan). Zarówno bufor do elektroforezy, jak i bufor do próbek powinien być traktowany inhibitorami RNaz np. DEPC lub RNazin (białko wiążące RNA).

1. Przygotować czystą probówkę o pojemności 1,5 ml. Umieścić w probówce 5 µl materiału RNA wyizolowanego metodą kolumnkową zaś do drugiej taką samą objętość materiału wyizolowanego za pomocą RNA Extracolu (materiał z ćwiczenia nr 2). Do każdej z probówek dodać po 5 µl buforu do obciążającego do próbek (RNA Gel Loading Dye 2x) wolnego od RNaz. Dokładnie wymieszać i zwirować, tak aby całość roztworu znajdowała się na dnie probówki.
2. Całość (10 µl) roztworu przenieść do studzienki w żelu agarozowym (zawierającym znacznik wiążący kwasy nukleinowe Midori Green Advance).
3. Elektroforezę prowadzić przy 70-100 V przez ok. 40 minut w buforze 1x TAE.
4. Po tym czasie rozdzielone cząsteczki RNA w żelu agarozowym obserwować w świetle lampy UV (transiluminator).



Powyżej znajduje się przykład żelu agarozowego po elektroforezie materiału RNA prawidłowego i degradowanego. W ramce obok schematycznie narysuj obraz wyizolowanego przez Twoją grupę RNA.

Oceń jakość wyizolowanego przez siebie RNA:

.....

Po izolacji całkowitego RNA z komórek i rozdzieleniu w żelu agarozowym widoczne są przede wszystkim cząsteczki.....W przypadku komórek eukariotycznych składają się one z podjednostek.....zaś w przypadku komórek prokariotycznych

W celu wykrycia konkretnych cząsteczek mRNA można użyć techniki:
.....

Zadanie 2. Reakcja Łańcuchowa Polimerazy.

WAŻNE! Pamiętaj o każdorazowej wymianie końcówek przy odpipetowywaniu nowego odczynnika (zapobieganie kontaminacji). Pracuj tylko w rękawiczkach z zachowaniem zasad sterylności!

1. Do sterylnej, podpisanej probówki o pojemności **0,2 ml** dodaj odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli nr 1- **Próbka PCR** (kolejność również istotna). Jeden zespół na grupę zamiast próbki PCR przygotowuje reakcję kontrolną NC z wykorzystaniem materiału z kontrolnego RT – kontrola czystości odczynników. Wszystkie czynności wykonuj trzymając probówkę cały czas na lodzie.

Tabela 1.

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka PCR	Próbka NC
Woda (DEPC)	-	5,5 µl	6,5
10x Pol Buffer C	1x	1 µl	1 µl
Starter FORWARD (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
Starter REVERSE (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
dNTPs (2 mM każdy)	0,2 mM	1 µl	1 µl
DNA (cDNA z ćwiczenia 3)		1 µl (RT)	1 µl RT-NC
Polimeraza Taq (0,5U/ µl)	0,25U	0,5 µl	0,5 µl

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

3. Zaprogramuj termocykler na następujący profil termiczny

Wstępna denaturacja: 3 min- 94°C

Cykl:

Denaturacja: 30 s- 94°C

Przyłączanie starów: 30 s- 51°C

Synteza nici: 30 s- 72°C

Ilość cykli: 40

Dodatkowa elongacja 5 min.-72°C

4. Umieść probówkę w termocyklerze i rozpocznij reakcję.

5. Po zakończeniu reakcji probówki z produktami PCR oddaj do pokoju przygotowawczego w celu przechowania do kolejnych zajęć. Produkty przechowywać w -20° C. Unikać częstego rozmrażania/zamrażania materiału. **Dokładnie podpisać swoje probówki, nr grupy i inicjałami!!!**

3. Bazy danych genów i sekwencji DNA- PubMed

Na podstawie przedstawionej poniżej pobranej z bazy PUBMED sekwencji cDNA o numerze NM_001101.4 dla ACTB uzupełnij informacje:

Ilość eksonów w genie i ich długości.....

.....

Długość sekwencji kodującej izoformę białka.....

Zapisz sekwencję 10 nukleotydów począwszy od 1 nukleotydu kodonu start

.....

Zapisz sekwencję 10 nukleotydów komplementarnych do 3 ' końca sekwencji kodującej

.....

Podaj cechy, które wskazują, że sekwencja powstała na matrycy mRNA

.....

Homo sapiens actin beta (ACTB), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_001101.4

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NM_001101 1940 bp mRNA linear PRI 11-AUG-2018
DEFINITION Homo sapiens actin beta (ACTB), mRNA.
ACCESSION NM_001101
VERSION NM_001101.4
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.
Summary: This gene encodes one of six different actin proteins.
Actins are highly conserved proteins that are involved in cell
motility, structure, integrity, and intercellular signaling. The
encoded protein is a major constituent of the contractile apparatus
and one of the two nonmuscle cytoskeletal actins that are
ubiquitously expressed. Mutations in this gene cause
Baraitser-Winter syndrome 1, which is characterized by intellectual
disability with a distinctive facial appearance in human patients.
Numerous pseudogenes of this gene have been identified throughout
the human genome. [provided by RefSeq, Aug 2017].

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the
publications that are available for this gene. Please see the Gene
record to access additional publications.

##Evidence-Data-START##

Transcript exon combination :: SRR1163658.119918.1, AK025375.1
[ECO:0000332]

RNAseq introns :: single sample supports all introns
SAMEA1966682, SAMEA1968189
[ECO:0000348]

##Evidence-Data-END##

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ SPAN	PRIMARY IDENTIFIER	PRIMARY SPAN	COMP
	1-108	DC327656.1	1-108	
	109-1444	AK130157.1	1-1336	
	1445-1920	BC009636.1	71-546	
	1921-1940	BU736098.1	1-20	c

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1940
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="7"
/map="7p22.1"

[gene](#) 1..1940
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/note="actin beta"
/db_xref="GeneID:60"
/db_xref="HGNC:HGNC:132"
/db_xref="MIM:102630"

[exon](#) 1..186
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"

[misc feature](#) 82..84
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/note="upstream in-frame stop codon"

[exon](#) 187..315
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"

[CDS](#) 193..1320
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/note="beta cytoskeletal actin; PS1TP5-binding protein 1;
I (2)-actin"
/codon_start=1
/product="actin, cytoplasmic 1"
/protein_id="NP_001092.1"
/db_xref="CCDS:CCDS5341.1"
/db_xref="GeneID:60"
/db_xref="HGNC:HGNC:132"
/db_xref="MIM:102630"
/translation="MDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHQGMV
VGMGQKDSYVGDEAQSQRGILTLKYPIDHGIIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHP
VLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFTNPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVT
HTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCY
VALDFEQEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHE
TTFNSIMKCDVDIRKDLANTVLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPAPPE
RKYSVWIGGSILASLSTFQQMMWISKQYDESGPSIVHRKCF"

[misc feature](#) 193..195

```
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="N-acetylmethionine. {ECO:0000244|PubMed:22814378};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P60709.1);
acetylation site"
misc feature 196..198
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="N-acetylaspartate, in Actin, cytoplasmic 1,
N-terminally processed. {ECO:0000244|PubMed:19413330,
ECO:0000244|PubMed:22223895, ECO:0000244|PubMed:22814378,
ECO:0000244|PubMed:25944712, ECO:0000269|Ref.8};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P60709.1);
acetylation site"
misc feature 322..324
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Methionine (R)-sulfoxide. {ECO:0000250}; propagated
from UniProtKB/Swiss-Prot (P60709.1); sulfatation site"
misc feature 331..333
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Methionine (R)-sulfoxide. {ECO:0000250}; propagated
from UniProtKB/Swiss-Prot (P60709.1); sulfatation site"
misc feature 409..411
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="Tele-methylhistidine.
{ECO:0000250|UniProtKB:P60710}; propagated from
UniProtKB/Swiss-Prot (P60709.1); methylation site"
misc feature 442..444
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/note="N6-methyllysine. {ECO:0000269|PubMed:23673617};
propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P60709.1);
methylation site"
exon 316..555
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"
exon 556..994
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"
exon 995..1176
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"
exon 1177..1922
/gene="ACTB"
/gene_synonym="BRWS1; PS1TP5BP1"
/inference="alignment:Splign:2.1.0"
```

ORIGIN

```
1 gagtgagcgg cgccggggcca atcagcgtgc gccgttcga aagttgcctt ttatggctcg
61 agcggccgcg cgccgcccct ataaaaccca gcggcgcgac gcgccaccac cgccgagacc
121 gcgtccgcgc cgcgagcaca gagcctcgcc ttgtccgacg cgccgcccgt ccacacccgc
181 cgccagctca ccatggatga tgatatcgcc gcgctcgctg tcgacaacgg ctccggcatg
241 tgcaaggccg gcttcgcggg cgacgatgcc ccccgggcgg tcttcccctc catcgtgggg
301 cgccccagc accagggcgt gatggtgggc atgggtcaga aggattccta tgtggcgac
361 gaggccca gcaagagagg catcctcacc ctgaagtacc ccacgagca cggcatcgtc
421 accaactggg acgacatgga gaaaatctgg caccacacct tctacaatga gctgcgtgtg
481 gctcccgagg agcaccgggt gctgctgacc gagggccccc tgaacccaa ggccaaccgc
541 gagaagatga cccagatcat gtttgagacc ttcaacacc cagccatgta cgttgctatc
601 caggctgtgc tatccctgta cgcctctggc cgtaccactg gcatcgtgat ggactccggt
661 gacgggggta cccacactgt gcccatctac gaggggtatg ccctccccc tgccatcctg
721 cgtctggacc tggctggcgg ggacctgact gactacctca tgaagatcct caccgagcgc
781 ggctacagct tcaccaccac ggccgagcgg gaaatcgtgc gtgacattaa ggagaagctg
841 tgctacgtcg ccttggaact cgagcaagag atggccacgg ctgcttcag ctctccctg
901 gagaagagct acgagctgcc tgacggccag gtcatcacca ttggcaatga gcgggtccgc
961 tgccctgagg cactcttcca gccttccttc ctgggcatgg agtcctgtgg catccacgaa
1021 actacattca actccatcat gaagtgtgac gtggacatcc gcaaagacct gtacgccaac
1081 acagtgcgtg ctggcgccac caccatgtac cctggcatgg ccgacaggat gcagaaggag
1141 atcactgccc tggcaccag cacaatgaag atcaagatca ttgctcctcc tgagcgcaag
1201 tactcgtgtg ggatcgggcg ctccatctcg gcctcgtgt ccaccttcca gcagatgtgg
1261 atcagcaagc aggagtatga cgagtcggcg ccctccatcg tccaccgcaa atgcttctag
1321 gcggactatg acttagttgc gttacaccct ttcttgacaa aacctaaact gcgcagaaaa
1381 caagatgaga ttggcatggc tttatttgtt ttttttgtt tgttttgtt ttttttttt
1441 ttttgcttg actcaggatt taaaaactgg aacggtgaag gtgacagcag tcggttgagg
1501 cgagcatccc ccaaagtcca caatgtggcc gaggactttg attgcacatt gttgtttttt
1561 taatagtcat tccaaatatg agatgcgttg ttacaggaag tccttgcca tcctaaaagc
1621 caccocactt ctctctaagg agaattggcc agtcctctcc caagtccaca caggggaggt
1681 gtagcattg ctttcgtgta aattatgtaa tgcaaaattt ttttaattt cgccttaata
1741 cttttttatt ttgttttatt ttgaatgatg agccttcgtg cccccccttc cccctttttt
1801 gtcccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggctccctt gggagtgggt ggaggcagcc
1861 aggggttacc tgtacactga cttgagacca gttgaataaa agtgacaccc ttaaaatga
1921 ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

//

4. Projektowanie starterów do PCR.

Na podstawie sekwencji kodującej 5'-ctagggtattggctagcgcgcgcgatgctgtgattagcctagctaaaggtt-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.....

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

5'-actttccgctaaggaaagactact

5'-accttggccttggtgtttttgttt

5'-aaaaccctggggttttcccagg

PROJEKT: KLONOWANIE SEKWENCJI KODUJĄCEJ INFY 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 cttggctggtt actgccagga cccatatgta aaagaagcag aaaaccttaa gaaatatttt
241 aatgcaggtc attcagatgt agcggataat ggaactcttt tcttaggcat tttgaagaat
301 tggaaagagg agagtgcagc aaaaataatg cagagccaaa ttgtctcctt ttacttcaaa
361 ctttttaaaa actttaaga tgaccagagc atccaaaaga gtgtggagac catcaaggaa
421 gacatgaatg tcaagttttt caatagcaac aaaaagaaac gagatgactt cgaaaagctg
481 actaattatt cggtactga cttgaatgtc caacgcaaag caatacatga actcatccaa
541 gtgatggctg aactgtcgcc agcagctaaa acagggaagc gaaaaaggag tcagatgctg
601 tttcgaggtc gaagagcatc ccagtaatgg ttgtcctgcc tgcaatattt gaattttaa
661 tctaaatcta tttattaata tttaacatta tttatatggg gaatatattt ttagactcat
721 caatcaata agtatttata atagcaactt ttgtgtaatg aaaaatgaata tctattaata
781 tatgtattat ttataattcc tatatcctgt gactgtctca cttaatcctt tgttttctga
841 ctaattaggc aaggctatgt gattacaagg ctttatctca ggggccaaact aggagccaa
901 cctaagcaag atcccatggg ttgtgtggtt atttcacttg atgatacaat gaacacttat
961 aagtgaagtg atactatcca gttactgccg gtttgaaaat atgcctgcaa tctgagccag
1021 tgctttaatg gcatgtcaga cagaacttga atgtgtcagg tgaccctgat gaaaacatag
1081 catctcagga gatttcatgc ctgggtgctt caaatattgt tgacaactgt gactgtaccc
1141 aaatggaaag taactcattt gttaaaatta tcaatatcta atatatatga ataaagtga
1201 agttcacac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

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

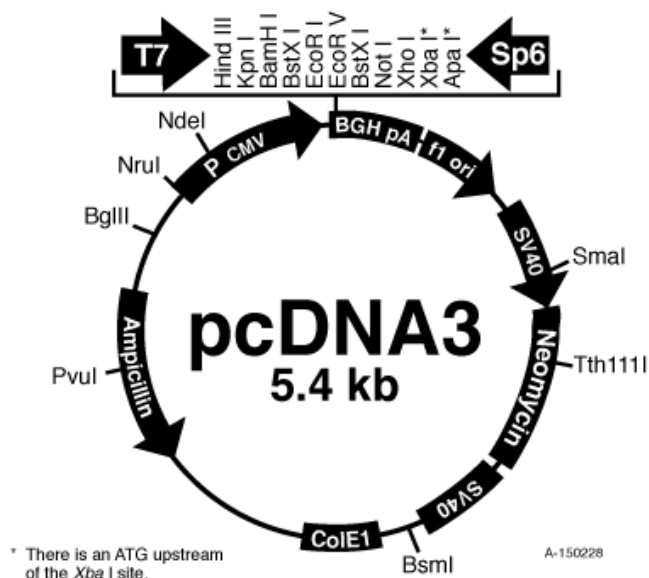
1 [AatII](#) G Δ ACGT C 2 [Acc65I](#) G GTAC Δ C 3 [AccI](#) GT MK Δ AC 4 [AclI](#) AA CG Δ TT 5 [AfeI](#) AGC Δ GCT 6 [AflIII](#) A CRYG Δ T 7 [AgeI](#) A CCGG Δ T 8 [AhdI](#) GACNN Δ N NNGTC 9 [AleI](#) CACNN Δ NNGTG 10 [ApaI](#) G Δ GGCC C 11 [ApaLI](#) G TGCA Δ C 12 [AscI](#) GG CGCG Δ CC 13 [AsiSI](#) GCG Δ AT CGC 14 [AvaI](#) C YCGR Δ G 15 [AvrII](#) C CTAG Δ G 16 [BaeGI](#) G Δ KGCM C 17 [BaeI](#) Δ (N)₅ (N)₁₂ACNNNNGTAYC(N)₁ Δ (N)₅ 18 [BamHI](#) G GATC Δ C 19 [BanI](#) G GYRC Δ C 20 [BanII](#) G Δ RGCY C 21 [BbvCI](#) CC TCA Δ GC 22 [BceAI](#) ACGGC(N)₁₂ NN Δ 23 [BcgI](#) Δ NN (N)₁₀CGA(N)₆TGC(N)₁₀NN 24 [BciVI](#) GTATCC(N)₅N 25 [BglII](#) A GATC Δ T 26 [BlpI](#) GC TNA Δ GC 27 [BmgBI](#) CAC Δ GTC 28 [BmtI](#) G Δ CTAG C 29 [BpmI](#) CTGGAG(N)₁₄NN 30 [BpuEI](#) CTTGAG(N)₁₄NN 31 [BsaAI](#) YAC Δ GTR 32 [BsaBI](#) GATNN Δ NNATC 33 [BsaHI](#) GR CG Δ YC 34 [BsaWI](#) W CCGG Δ W 35 [BsaXI](#) Δ NNN(N) Δ C(N) Δ CTCC(N) Δ NNN 36 [BseYI](#) C CCAG Δ C 37 [BsgI](#) GTGCAG(N)₁₄NN 38 [BsiEI](#) CG Δ RY CG 39 [BsiHKAI](#) G Δ WGCW C 40 [BsiWI](#) C GTAC Δ G 41 [BsmBI](#) CGTCTCN NNNN Δ 42 [BsmFI](#) GGGAC(N)₁₀NNNN Δ 43 [BsmI](#) GAATG Δ CN 44 [BsoBI](#) C YCGR Δ G 45 [Bsp1286I](#) G Δ DGCH C 46 [BspDI](#) AT CG Δ AT 47 [BspEI](#) T CCGG Δ A 48 [BspHI](#) T CATG Δ A 49 [BsrBI](#) CCG Δ CTC 50 [BsrDI](#) GCAATG Δ NN 51 [BsrGI](#) T GTAC Δ A 52 [BssHII](#) G CGCG Δ C 53 [BssSI](#) C ACGA Δ G 54 [BstAPI](#) GCAN Δ NNN NTGC 55 [BstUI](#) CG Δ CG 56 [BstXI](#) CCAN Δ NNNN NTGG 57 [BstZ17I](#) GTA Δ TAC 58 [Bsu36I](#) CC TNA Δ GG 59 [BtgZI](#) GCGATG(N)₁₀NNNN Δ 60 [BtsI](#) GCAGTG Δ NN 61 [ClaI](#) AT CG Δ AT 62 [CspCI](#) Δ NN (N)₁₂CAA(N)₅GTGG(N)₁₀NN 63 [DraIII](#) CAC Δ NNN GTG 64 [EaeI](#) Y GGCC Δ R 65 [EagI](#) C GGCC Δ G 66 [EciI](#) GGCGGA(N)₉NN 67 [Eco53kI](#) GAG Δ CTC 68 [EcoNI](#) CCTNN N Δ NNAGG 69 [EcoRI](#) G AATT Δ C 70 [EcoRV](#) GAT Δ ATC 71 [Esp3I](#) CGTCTCN NNNN Δ 72 [FauI](#) CCCGCNNNN NN Δ 73 [FseI](#) GG Δ CCGG CC 74 [FspI](#) TGC Δ GCA 75 [HaeII](#) R Δ GCGC Y 76 [HgaI](#) GACGC(N)₅(N)₅ Δ 77 [HhaI](#) G Δ CG C 78 [HinPI](#) G CG Δ C 79 [HindIII](#) A AGCT Δ T 80 [HpaI](#) GTT Δ AAAC 81 [Hpy99I](#) Δ CGWCG 82 [HpyAV](#) CCTTC(N)₅N 83 [HpyCH4IV](#) A CG Δ T 84 [KasI](#) G GCGC Δ C 85 [KpnI](#) G Δ GTAC C 86 [MfeI](#) C AATT Δ G 87 [MluI](#) A CGCG Δ T 88 [MscI](#) TGG Δ CCA 89 [MspAII](#) CMG Δ CKG 90 [NaeI](#) GCC Δ GGC 91 [NarI](#) GG CG Δ CC 92 [NciI](#) CC S Δ GG 93 [NgoMIV](#) G CCGG Δ C 94 [NheI](#) G CTAG Δ C 95 [NmeAIII](#) GCCGAG(N)₁₀NN 96 [NotI](#) GC GGCC Δ GC 97 [NruI](#) TCG Δ CGA 98 [NsiI](#) A Δ TGCA T 99 [PacI](#) TTA Δ AT TAA 100 [PaeR7I](#) C TCGA Δ G 101 [PciI](#) A CATG Δ T 102 [PflFI](#) GACN N Δ NGTC 103 [PluII](#) G Δ GCGC C 104 [PmeI](#) GTTT Δ AAAC 105 [PmlI](#) CAC Δ GTG 106 [PshAI](#) GACNN Δ NNGTC 107 [PspOMI](#) G GGCC Δ C 108 [PspXI](#) VC TCGA Δ GB 109 [PstI](#) C Δ TGCA G 110 [PvuI](#) CG Δ AT CG 111 [PvuII](#) CAG Δ CTG 112 [RsrII](#) CG GWC Δ CG 113 [SacI](#) G Δ AGCT C 114 [SacII](#)

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla III roku Analityki Medycznej

CCAGC 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 NGGCC 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

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 III roku Analityki Medycznej

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.)
.....