

Занятие №2. ПЦР как основа ГЕНОМНЫХ МЕТОДИК

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- Метод, позволяющий избирательно синтезировать большие количества определённых фрагментов ДНК.
- Разработан Кэри Муллисом в 1983 году (Нобелевская премия 1993 года)
- “Полимеразная” – используется фермент ДНК-полимераза
- “Цепная” – состоит из повторяющихся циклов, количество ДНК с каждым циклом увеличивается в геометрической прогрессии

Виды ПЦР

- 1. В зависимости от измерения количества ПЦР-продукта:
 - качественная
 - количественная

- 2. Тип детекции ПЦР-продукта:
 - электрофоретическая
 - флюориметрическая

- 3. Этап детекции:
 - в конечной точке
 - в реальном времени

Применение ПЦР

- I. Получение информации
 - генотипирование
 - ДНК-диагностика
 - анализ уровня транскрипции

- II. Получение материала (накопление)
 - клонирование
 - мутагенез
 - секвенирование

Компоненты ПЦР-реакции

Компонент	Функция

Состав реакционной смеси ПЦР

- $V_{PC} = 10-50$ мкл
- ДНК 1-20 пг/мкл (плазмиды, фаги) или
2-20 нг/мкл (геном)
- дНТФ 0,2 мМ
- праймеры 0,2-1 мкМ
- полимераза 0,01-0,05 е.а./мкл

Этапы ПЦР

Этап	Температура, °С	Продолжительность, мин.	Количество циклов

Наиболее применяемые ДНК-полимеразы

Полимераза	Процессивность	Активность	Температурный оптимум

Денатурация (denaturation)

- Необходима для разрушения водородных связей между комплементарными цепями ДНК (плавление ДНК)
- 1. **Температура (T_d):** определяется свойствами полимера, обычно составляет 95°C . Для более термостойких полимеров (Pwo) температура может быть увеличена.
- 2. **Время:** для крупных молекул (геномы) увеличивается, для малых (ампликоны) – уменьшается; время нужно также увеличивать в случае $\text{GC}\% > 50\%$.

Отжиг (annealing)

- На этом этапе происходит понижение температуры, и праймеры могут присоединиться к комплементарным участкам на матрице ДНК
- **Температура (T_a):** зависит от состава праймеров, который определяет температуру плавления (melting) комплекса праймер–матрица ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$).

Критерии подбора праймеров

- 1. GC-состав должен быть в пределах 40-60%. При этом G/C должны быть распределены равномерно (не образовывать кластеров).
- 2. Температура плавления у прямого и обратного праймера должна отличаться не более, чем на 5°C.
- 3. Должны отсутствовать самокомплементарные участки как внутри праймера (иначе могут образовываться шпильки), так и между праймерами (иначе образуются димеры праймеров).
- 4. Лучше, если на 3'-конце праймеров будут G/C (связь сильнее), но не более 3х (чтобы не было отжига на неспецифические участки).

Температура плавления праймеров

- $T_m = 4 * [n(G) + n(C)] + 2 * [n(A) + n(T)]$

- где $n(X)$ - количество нуклеотида X в праймере

Элонгация

- На этапе элонгации происходит синтез цепей ДНК с помощью ДНК-полимеразы.
- 1. **Температура:** определяется свойствами используемой ДНК-полимеразы и лежит в области оптимума для этого фермента (для Taq – 72°C).
- 2. **Время:** рассчитывают по одной минуте на каждую т.п.н. ампликона (для небольших молекул обычно берут 0,5 мин.).

Онлайн-ресурсы для подбора условий ПЦР

- Хранилище нуклеотидных последовательностей генов:
 - *National Center for Bioinformatics* (*ncbi.nlm.nih.gov/gene*)
- Подбор праймеров:
 - *Primer3* (*bioinfo.ut.ee/primer3/*)
 - *Primer-BLAST* (*ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/*)
- Проведение расчётов (концентрации, операции с нуклеотидными последовательностями) и мн. др.:
 - *MOLBIOL* (*molbiol.ru/scripts*)

Домашнее задание №1: подбор праймеров.

1. Найти на NCBI в базе данных Gene запись о каком-нибудь гене, открыть её.

The screenshot shows the NCBI Gene database search results for the query "topoisomerase I Saccharomyces". The search results are displayed in a table with columns for Name/Gene ID, Description, Location, Aliases, and MIM. The first result, TOP1 (ID: 854156), is circled in red. The table lists various genes, including TOP1, SIR2, TOP2, FOB1, TDP1, IDA10, IDA11, TOP2A, TP53, NDAI0_00530, PARP1, KLTH0C10890g, DEHA2F09988g, AGOS_ACL008C, and KLLA0_C06116g.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input checked="" type="checkbox"/> TOP1 ID: 854156	DNA topoisomerase 1 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome XV, NC_001147.6 (313078..315387, complement)	YOL006C, MAK1, MAK17	
<input type="checkbox"/> SIR2 ID: 851520	NAD-dependent histone deacetylase SIR2 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome IV, NC_001136.10 (376757..378445, complement)	YDL042C, MAR1	
<input type="checkbox"/> TOP2 ID: 855636	DNA topoisomerase 2 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome XIV, NC_001146.8 (457704..461990)	YNL088W, TOR3, TRF3	
<input type="checkbox"/> FOB1 ID: 851688	replication fork barrier binding protein FOB1 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome IV, NC_001136.10 (676102..677802)	YDR110W, HRM1	
<input type="checkbox"/> TDP1 ID: 852525	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome II, NC_001134.8 (668663..670297, complement)	YBR223C	
<input type="checkbox"/> IDA10 ID: 853119	putative ATP-dependent kinase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome VII, NC_001139.9 (909213..910085)	YGR205W	
<input type="checkbox"/> IDA11 ID: 856564	Tda11p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C]	Chromosome VIII, NC_001140.6 (417549..419063)	YHR159W	
<input type="checkbox"/> TOP2A ID: 7153	DNA topoisomerase II alpha [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 17, NC_000017.11 (40388521..40417950, complement)	TOP2, TP2A	126430
<input type="checkbox"/> TP53 ID: 7157	tumor protein p53 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 17, NC_000017.11 (7668402..7687550, complement)	BCC7, LFS1, P53, TRP53	191170
<input type="checkbox"/> NDAI0_00530 ID: 11494125	hypothetical protein [<i>Naumovozyma dairenensis</i> CBS 421]	Chromosome 10, NC_016488.1 (102751..106920, complement)	NDAI_00530	
<input type="checkbox"/> PARP1 ID: 142	poly(ADP-ribose) polymerase 1 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 1, NC_000001.11 (226360691..226408100, complement)	ADPRT, ADPRT1, ADPRT1, ARTD1, PARP, PARP-1, PPOL, pADPRT-1	173870
<input type="checkbox"/> KLTH0C10890g ID: 8291574	KLTH0C10890p [<i>Lachanea thermotolerans</i> CBS 6340]	Chromosome C, NC_013079.1 (894335..896605, complement)	KLTH0C10890g	
<input type="checkbox"/> DEHA2F09988g ID: 2904211	DEHA2F09988p [<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767]	Chromosome F, NC_006048.2 (862319..864688)	DEHA2F09988g	
<input type="checkbox"/> AGOS_ACL008C ID: 4619521	ACL008Cp [<i>Eremothecium gossypii</i> ATCC 10895]	Chromosome III, NC_005784.3 (341154..343352, complement)	AGOS_ACL008C, ACL008C	
<input type="checkbox"/> KLLA0_C06116g ID: 4619521	uncharacterized protein [<i>Kluyveromyces lactis</i>]	Chromosome C, NC_006039.1 (426604..428804, complement)	KLLA0_C06116g	

The search results are displayed in a table with columns for Name/Gene ID, Description, Location, Aliases, and MIM. The first result, TOP1 (ID: 854156), is circled in red. The table lists various genes, including TOP1, SIR2, TOP2, FOB1, TDP1, IDA10, IDA11, TOP2A, TP53, NDAI0_00530, PARP1, KLTH0C10890g, DEHA2F09988g, AGOS_ACL008C, and KLLA0_C06116g.

2. Открыть последовательность гена в формате FASTA.

TOPI DNA topoisomerase 1 [S: X]

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/854156

Genomic regions, transcripts, and products

Genomic Sequence: NC_001147.6

Go to reference sequence details

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

Nucleotide FASTA report

NC_001147.6: 316K..313K (3.0Kbp) C

Genes, RefSeq propagation from SGD, annotation version R64-2-1

TOP1

6381

NP_081183268.1

NP_014637.1

Bibliography

Related articles in PubMed

1. [Topoisomerase I and Genome Stability: The Good and the Bad.](#)
Cho JE, et al. Methods Mol Biol. 2018. PMID 29177731
2. [Effects of camptothecin or TOP1 overexpression on genetic stability in Saccharomyces cerevisiae.](#)
Sloan R, et al. DNA Repair (Amst). 2017 Nov. PMID 28961461,
3. [Genome-destabilizing effects associated with top1 loss or accumulation of top1 cleavage complexes in yeast.](#)
Andersen SL, et al. PLoS Genet. 2015 Apr. PMID 25830313, [Free PMC Article](#)
4. [Error-free and mutagenic processing of topoisomerase 1-provoked damage at genomic ribonucleotides.](#)
Sparks JL, et al. EMBO J. 2015 May 5. PMID 25777529, [Free PMC Article](#)
5. [Topoisomerase I plays a critical role in suppressing genome instability at a highly transcribed G-quadruplex-forming sequence.](#)
Yadav P, et al. PLoS Genet. 2014 Dec. PMID 25473954, [Free PMC Article](#)

[See all \(151\) citations in PubMed](#)

[See citations in PubMed for homologs of this gene provided by HomoloGene](#)

GeneRIFs: Gene References Into Functions [What's a GeneRIF?](#)

1. [Studies demonstrate opposing roles of Top1 activity in either promoting or destabilizing genome integrity. Resolution of transcription-associated negative supercoils, for example, prevents pairing of the nascent RNA with the DNA template \(R-loops\) as well as DNA secondary structure formation. Reduced Top1 levels thus enhance CAG repeat contraction, somatic hypermutation, and class switch recombination.](#)
2. [Our findings reveal a requirement for the Smc5/6 complex, including Mms21/Nse2 mediated sumoylation, and topoisomerase-1 \(Top1\), for maintaining stability of a chromosome having low origin density and suggest a functional cooperation between the Smc5/6 complex and Top1 in maintenance of topologically challenged chromosomes prone to replication fork collapse or accumulation of torsional stress](#)
3. [Our findings reveal a functional interplay between Mms21 and Top1 in maintenance of longer chromosomes, and suggest that lack of sumoylation of Mms21 targets coupled with Top1 deficiency is a crucial requirement for accurate inheritance of longer chromosomes.](#)
4. [Too much, as well as too little of Top1 is detrimental to eukaryotic genomes, and that CPT has destabilizing effects that extend beyond those associated with DSB formation.](#)
5. [The authors demonstrate biochemically that irreversible double-strand breaks are generated by subsequent Top1 cleavage on the opposite strand from the Top1-induced DNA nicks at ribonucleotide sites.](#)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001147.6?report=fasta&from=313078&to=315387&strand=true the rDNA and clarifies a structural role of DNA topoisomerase I in the epigenetic regulation of rDNA, independent of its known catalytic

BioAssay by Target (Summary)

BioProjects

BioSystems

Conserved Domains

Full text in PMC

Full text in PMC_nucleotide

Functional Class

Gene neighbors

Genome

GEO Profiles

HomoloGene

Nucleotide

Probe

Protein

PubMed

PubMed (GeneRIF)

PubMed(nucleotide/PMC)

RefSeq Proteins

RefSeq RNAs

Taxonomy

Links to other resources

SGD

KEGG

General information

About Gene

FAQ

FTP site

Help

My NCBI help

NCBI Handbook

Statistics

EN 14:04 21.09.2018

3. В последовательности выбрать первые 1000 нуклеотидов и сохранить в текстовый файл.

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database interface. The main content area displays the complete sequence of Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XV. The sequence is shown in FASTA format, starting with >NC_001147.6:c315387-313078 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XV, complete sequence. The sequence text is visible, starting with ATGACTATTGCTGATGCTTCCAAAGTTAATCATGAGTTGCTCTTCTGATGACGATGACGATGTCGCAITAT.

On the right side, the 'Change region shown' panel is highlighted with a red circle. It contains the following options and fields:

- Change region shown**
- Whole sequence
- Selected region
- from: 313078 to: 315387
-

Below this panel, the 'Customize view' panel is also visible, with the 'Show reverse complement' checkbox checked. The 'Send to' dropdown menu is also highlighted with a red circle.

The bottom of the screenshot shows the Windows taskbar with various application icons, including CAPSA (E), Поиск гена - Paint, Saccharomyces C..., and Занятие 2. - ПЦР...

4. “Наивный” подбор праймеров: с помощью сайта Molbiol составить праймеры (по 20 нуклеотидов) (прямой праймер совпадает с началом последовательности, обратный – комплементарен перевёрнутому концу последовательности)

The screenshot shows a web browser window with the URL `molbiol.ru/scripts/01_12.html`. The page title is "Простые преобразования" (Simple Transformations). The main heading is "Операции с нуклеотидной последовательностью" (Operations with nucleotide sequence). The tool is designed for "Дополнить" (Extend) operations. It includes a text input field for a name, a large text area for the nucleotide sequence, and radio buttons to select the case (lowercase, uppercase, or as in original) and whether to preserve gaps. Below the input fields are buttons for "Перевести" (Translate) and "Очистить" (Clear). There are also checkboxes for output options: "выводить по 50 нуклеотидов в строке" (output 50 nucleotides per line), "вывести исходную последовательность" (output original sequence), "прочитать последовательность в обратном направлении" (read sequence in reverse), "прочитать комплементарную последовательность в 5' -> 3' направлении" (read complementary sequence in 5' to 3' direction), "прочитать комплементарную последовательность в 3' -> 5' направлении" (read complementary sequence in 3' to 5' direction), and "вывести двухцепочечную последовательность" (output double-stranded sequence). A paragraph explains that a special program can be used to read the sequence aloud or create a random sequence of a given length and GC content. At the bottom, there is a table titled "Стандартные обозначения полиморфных позиций:" (Standard notations for polymorphic positions:).

Символ	Обозначает	Объяснение
R	A или G	purine

Navigation links at the top include: ГЛАВНАЯ · ПРОЕКТ · СПРАВОЧНИК · МЕТОДЫ · РАСТВОРЫ · РАСЧЁТЫ · ЛИТЕРАТУРА · ЗАДАЧИ · FULL TEXT · ОРГ.ВОПРОСЫ · WEB · ФИРМЫ · КАРТА САЙТА · COFFEE BREAK · КАРТИНКИ · РАБОТЫ И УСЛУГИ · БИРЖА ТРУДА · ФОРУМЫ · 000000 · Zbio-wiki · Хеликон · Диам · ИнтарЛабСервис · Beckman Coulter · SkyGen · ОПТЭК · BIOSCAD · Европа · Синтол · Биолайн · Sartorius · Химэксперт · СибЭвзим · Тесал · Даникс · НПП "ТРИС" · Биалекса · ФизЛабПрибор · Genotek · АТФ Сервис Ген · Биоген-Аналитика

Additional links: NG SEQUENCING · ЖИЗНЬ РАСТЕНИЙ · БИОХИМИЯ · ГОРОДСКИЕ КОМАРЫ · А.А.ЛЮБИЦЕВ · ИСТОРИЯ ЗООМУЗЕЯ

Right sidebar: Смотри также: /ссылки на сетевые ресурсы/ (Расш. форма) (Скр./Откр.)

Bottom status bar: 14:17 21.09.2018

5. Подбор “оптимальных” праймеров: скопировать последовательность и вставить в окошко на сайте Primer3; установить длину амплифицируемого фрагмента 900-1000, нажать Pick primers.

The screenshot shows the Primer3 web interface. At the top, there are navigation links: "Checks for mispriming in template.", "Primer3 Home", "Primer3plus interface", "disclaimer", "cautions", and "FAQ/WIKI". Below this, a message states: "There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>".

The main input area contains a text box with a DNA sequence: `GTGTGTTTCATTGCGATATGAGCATGTTACTTTGAAACCTCCGAACTGTTTATCTTTGATTTCITAGG
TAAGGATTCATTAGATTTTTATCAAGAGGTAGAGTTGACAAACAGTTTTCAAAAATTTGACAAATTTT
AAAAGSCCGCCCAACAGCCAGGACATCAACTGTTTGAATGCTAGATCCATCTACTGAAACAATATC
TACAAACTACATGSCCGGATTTGATGCTAAGTTTTCCGACATATAATGCTCCAAAACAATSCAAGA
TCAACTGATCTAATTTCCAAATAAAGGATCTGTGTCAGAGAAATATGAAGTACAAACAGCAAAATAGA
ACTGTAGCCATCCTATGTAAACCATCAAAAGACTGTACAGAAAGGSCATGCAAAACAAGTGTAAAAGGCCA
ATAATTAATACAAAGATTTGAAATGSCAAAGATTTGTTGCAAAAGGSCATTTTACAAATTTGAAATAGGA`. A red arrow points to the "N" in the instructions below the text box.

Below the text box, there are three checkboxes: "Pick left primer, or use left primer below:", "Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:", and "Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):".

There are two "Pick Primers" buttons, one of which is circled in red. A "Reset Form" button is also present.

Configuration options include: "Sequence Id:" (text input), "Targets:" (text input), "Excluded Regions:" (text input), "Product Size Ranges 900-1000" (text input, circled in red), "Number To Return 5", "Max 3' Stability 9.0", "Max Repeat Mispriming 12.00", "Pair Max Repeat Mispriming 24.00", "Max Template Mispriming 12.00", and "Pair Max Template Mispriming 24.00".

The "General Primer Picking Conditions" section includes: "Primer Size" (Min: 18, Opt: 20, Max: 27), "Primer Tm" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max Tm Difference: 100.0), "Product Tm" (Min: , Opt: , Max:), "Primer GC%" (Min: 20.0, Opt: , Max: 80.0), "Max Self Complementarity: 8.00", "Max 3' Self Complementarity: 3.00", "Max #N's: 0", "Max Poly-X: 5", "Inside Target Penalty: ", "Outside Target Penalty: 0", "First Base Index: 1", "CG Clamp: 0", "Concentration of monovalent cations: 50.0", "Salt correction formula: Schildkraut and Lifson 1965", "Concentration of divalent cations: 0.0", and "Concentration of dNTPs: 0.0".

The Windows taskbar at the bottom shows the system tray with the date and time: 14:23, 21.09.2018.

7. Проверка качества “наивных” праймеров: вставить последовательности “своих” праймеров и нажать Pick primers; в файле указать характеристики праймеров и причины, по которым они не подходят (указаны в отчёте программы).

The screenshot shows the Primer3 web interface in a browser window. The browser tabs include 'Saccharomyces cerevisiae S288c', 'Простые преобразования', and 'Primer3 Input (version 0.4.0)'. The address bar shows 'bioinfo.ebc.ee/primer3-0.4.0/'. The page title is 'Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.' There are navigation links for 'Checks for mispriming in template.', 'disclaimer', 'Primer3 Home', 'Primer3plus interface', 'cautions', and 'FAQ/WIKI'. A notice states: 'There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>'. The main form contains a text area for the source sequence (FASTA format ok) and a dropdown for 'Mispriming Library (repeat library)'. Below the sequence, there are two radio buttons: 'Pick left primer, or use left primer below.' (checked) and 'Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):' (checked). The left primer input field contains 'ATTGTTGTTCAATGGATAT' and the right primer input field contains 'TTAAAACCTCCAATTTTCAT'. Below the input fields are 'Pick Primers' and 'Reset Form' buttons. Further down, there are fields for 'Sequence Id.', 'Targets', 'Excluded Regions', and 'Product Size Ranges'. There are also several checkboxes for 'Number To Return', 'Max Repeat Mispriming', 'Pair Max Repeat Mispriming', 'Max Template Mispriming', and 'Pair Max Template Mispriming'. At the bottom, there is a section for 'General Primer Picking Conditions' with various input fields for 'Primer Size', 'Primer Tm', 'Product Tm', 'Primer GC%', 'Max Self Complementarity', 'Max 3' Self Complementarity', 'Max #N's', 'Max Poly-X', 'Inside Target Penalty', 'Outside Target Penalty', 'First Base Index', 'CG Clamp', 'Concentration of monovalent cations', 'Salt correction formula', 'Concentration of divalent cations', and 'Concentration of dNTPs'. The Windows taskbar at the bottom shows the system tray with the date '14:42 21.09.2018' and several open applications including 'CAPSA (E)', 'Праймеры - Paint', 'Primer3 Input (ver...', and 'Занятие 2. - ПЦР...'

Итого

- Нужно прислать по почте текстовый файл (Фамилия_группа.doc), в котором есть:
- Исходная последовательность.
- “Наивные” праймеры, их температура плавления и причины, по которым не подходят.
- “Оптимальные” праймеры и их температура плавления.
- Последовательность и длина продукта ПЦР с “оптимальными” праймерами.