

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 $GC\% > 50\%$.

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 search results are also displayed in a list view on the left side of the page. The search criteria are shown in the search bar at the top, and the search results are displayed in a table below. The search results are also displayed in a list view on the left side of the page. The search criteria are shown in the search bar at the top, and the search results are displayed in a table below. The search results are also displayed in a list view on the left side of the page.

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	

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 for the sequence NC_001147.6. The main content area displays the complete sequence of Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XV. On the right side, the 'Change region shown' panel is highlighted with a red circle, showing the 'Selected region' option with 'from: 313078' and 'to: 315387' fields. The 'Send to' dropdown is also highlighted with a red circle.

FASTA - Send to: ▾

Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XV, complete sequence
NCBI Reference Sequence: NC_001147.6
[GenBank](#) [Graphics](#)

>NC_001147.6:c315387-313078 Saccharomyces cerevisiae S288C chromosome XV, complete sequence
ATGACTATTGCTGATGCTTCCAAAGTTAATCATGAGTTGCTCTTCTGATGACGATGACGATGTCCTTAT
CTCAAACTTTAAAAAAGAAAGTGGCGTCCATGACTCTGCTCTCTTCAAGACGAAAGCGAACCTTA
TGATAGTATGAGGCAATCTCTAAGATTTCCANGAANAAGACTANGAANAATAAGACCGAACCGATGCA
TCGTCGCTCATTACCATCGCTCCAGCAAAAGAAAGCGGACATCAAAAGCTAAAAAATCAAGAAAGAG
ATGGTGTATTAAGGTAAAAACAATAAAAAGGAGAAACAGGAGAAACGAAAAAAGAAACGAGAAAGAGA
AGAAGAGGAGGACAAAGAAAGCGAAGGAGGAGGAGGAAGATATAAATGGTGGAAAAAAGAAAAAGAA
GACACCAAAATGGGTCAACTGAAGCATAACGGTGTATATTCCTCCACCATACCGACCTTACCAT
CTCACATCAAAATATATTACGATGGGAAGCCAGTAGATTTACCTCCGCAAGCTGAAGAAAGTAGCCGGT
CTTTGCTGCCCTATTAGAGAGTGATCATGCCAAAAATCCTGTTTTCCAAAAAGAACTTCTTCAATGATT
TTGCAAGTACTGAAAGAAAGTGGTGGTCCCTCAATGGAATTGAGATAAAGAAATTTCTCGTTGCGATT
TCACCAAAATGTTTGATTACTTCCAGTTACAAAAAAGACAGAAAAAGCAACTGACTCCCAAGAAAAAGAA
ACAGATTCGTTTGGAAAGAGAAAAATTCGAGGAAGATTATAAATCTGTGAATTAGATGGCAGAAAGGAA
CAAGTAGGAAATTCAGGTTGAACCTCCTGATCTATTTAGAGTCTGTCGCTCACCACAAAAACAGGCA
AATTGAAGAGAGAGTGAATCCTGAGGATATCGTTTTAAATCTAAGTAAGACGCAACCGTTCGCGCACG
CCCAGAGGSCCAAGTGGGTTGAATCAGACACGCAATACCGTTCATGGTTAGCCATGTGAGAGAG
AATATTTCAACTCATTCAAAATAGTCAGATTGGCAGCGCACTCTTCAATGAAGGTCAAAAGTGACTACA
AGAAGTTTGAAGAAGCGAGACAAATGAAATCCTATATCGATGCCATCAGAAAGGATACAGAGAAATTT
GAAAGCAAAATGATGCTAGAGCGCCAAAAGGCCGTAGCCATTTATTTGATCGATGATTTTCGTTTAAAG
GCCGGTGGTGAATAATCCGAAAGATGAAGCCGATACGTGGGTTGTTGTTCAITTCGATATGAGCATGTTA
CTTTGAAACCTCCGAATACTGTTATCTTTGATTTCTTAGTAAAGATCTATAGATTTTATCAAGAGGT
AGAAGTTGACAAACAAGTTTTCAAAAATTTGACAAATTTTAAAGGCCGCCAAACAGCCAGGACATCAA
CTGTTGATCGTCTAGATCCATCTATACTGAACAAATATCTCAAAAATCTAGCTCGCGGATTTGACTGCTA
AAGTTTTCCGTACTATATGCTTCCAAAACRATGCAAGATCAACTGATCTAATTCBAATAAAGGATC
TGTGCGAGGAAAAATTTAAGTACAAAGCAGCAAAATAGAACTGTAGCCATCTATGTAACCATCAAAG
ACTGTCAAGAGGGGCTGCAAAAACAGTGGAAAAGGCCAATATAGAAATACAGAGTTGGAATGGCAA
AGATTCGTTCAAGAGGSCCTTTACAAATGGATANGATCTTTAAAGAAAGACCAAAATATTTGGA
AGAAATCGACGATTTGACGAAAGAGATGAAGCCACCATTCACAGAGAAATTTGATAGAGAAATGAA
AAATACAGCGAAATTTGTTAGGAGAGCGATAAGAGGAAATTTGAAAGGAGAAATTTATGGCGGAA
GTCAATTTGAAGAAATGGTTGGAGAAAGTCCGACGAAAGAAACAGAAATTCGAAAGGAAATTTGAAACCGG
TGAAGTGAAGTGAATCAAGTTGGAATTCAGTGGAAAAATAAAGCACAGTAGAGAAATTTGAACAG
CGTATCCAACTAGTTCATTCAGTTGAAGATAAAGGAGAAATCCCAAGGTTTCACTGGGACCTTCCA
AAATCAATATATAGACCTAGACTTTCTGTGTTATTTGCAAAAAGTATGATGTTCCGATTTGAAAGAT
TTTTCAAAAACCTAAGAGAAAAATCAAATGGCCATAGAAATCGGTAGATGAAATTTGAGGTTTTAA

Change region shown

Whole sequence
 Selected region
from: 313078 to: 315387
[Update View](#)

Customize view

Display options
 Show reverse complement
[Update View](#)

Analyze this sequence

Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

Related information

Assembly
BioProject
Protein
PubMed
Taxonomy
BioAssay by RNA target
Components (Core)
Full text in PMC
Gene
Genome
HomoloGene

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). Below the heading, there is a form for inputting a nucleotide sequence. The form includes a text input field for the name, a text input field for the sequence, and several radio button options for formatting (lowercase, uppercase, or as in original) and preserving gaps. There are also checkboxes for output options like "вывести исходную последовательность" (output original sequence) and "вывести двухцепочечную последовательность" (output double-stranded sequence). A "Перевести" (Translate) button is present. At the bottom, there is a table of standard notation for polymorphic positions.

Молбиол.ру > Расчёты > Нукл. последовательности > Простые преобразования

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 · ВЛОСAD · Европа · Синтол · БиоЛайн · Sartorius · Химэксперт · СибЭвзим · Тесал · Даникс · НПП "ТРИС" · Биалекса · ФизЛабПрибор · Genotek · ATF Сервис Ген · Биоген-Аналитика

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

Операции с нуклеотидной последовательностью

Дополнить *Форма проводит простейшие манипуляции с нуклеотидной последовательностью. Можно проводить как одиночные преобразования, так и несколько преобразований за раз.*

Название (не обязательно):

Нуклеотидная последовательность без названия:
игнорируются любые знаки, кроме: `agctuswrymkhbdvn`
в качестве символов пробела воспринимаются: `"nn nn", "nn.nn", "nn.nn"`

строчные
 заглавные
 как в исходной

T U

сохранять пробелы?
 нет да

выводить по нуклеотидов в строке;
 вывести исходную последовательность;
 прочитать последовательность в обратном направлении;
 прочитать комплементарную последовательность в 5' --> 3' направлении;
 прочитать комплементарную последовательность в 3' --> 5' направлении.
 вывести двухцепочечную последовательность.

Прочитать нуклеотидную последовательность вслух можно с помощью [специальной программы](#). Создать случайную последовательность заданной длины и GC-состава можно с помощью программы "[Случайная последовательность нуклеотидов](#)". Чтобы транслировать последовательность можно воспользоваться формой "[Трансляция нуклеотидной последовательности](#)". Если нужно найти редкие кодоны, то лучше использовать форму "[Поиск редких кодонов в кодирующей последовательности](#)" (кстати, она выдаёт пронумерованные последовательности).

Стандартные обозначения полиморфных позиций:

Символ	Обозначает	Объяснение
R	A или G	puRine

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. The browser 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", "Primer3plus interface", "disclaimer", "cautions", "Primer3 Home", and "FAQ/WIKI".

The main instruction says: "There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>". Below this, it asks to "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 \(repeat library\)](#):".

A DNA sequence is pasted into the input field:

```
GTGTGTTCATTGCGATATGAGCATGTTACTTTGAAACCTCCGAACTGTTATCTTTGATTCTTAGG  
TAAGGATTCATTAGATTTTTATCAAGAGGTAGAGTTGACAAACAGTTTTCAAAAATTTGACAAATTTT  
AAAAGSCCGCCCAACAGCCAGGACATCAACTGTTTGTCTGCTAGATCCATCTACTGAAACAATATC  
TACAAACTACATGSCCGGATTGACTGCTAAGTTTTCCGACATATAATGCTCCAAAACAATSCAAGA  
TCAACTGATCTAATTTCCAAATAAAGGATCTGTGTCAGAGAAATATGAAGTACAAACAGCAAAATAGA  
ACTGTAGCCATCCTATGTAAACCATCAAAAGACTGTACAGAAAGGSCATGCAAAACAAGTGTAAAAGGCCA  
ATAATTAATACAAAGATTGAAATGSCAAAGATTCGTTGCAAAAGGSCATTTTACAAATTTGAAATAGGA
```

Below the sequence, there are checkboxes for primer selection:

- Pick left primer, or use left primer below:
- Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:
- Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Buttons for "Pick Primers" and "Reset Form" are visible. The "Pick Primers" button is circled in red.

Below the checkboxes, there are input fields for "Sequence Id:", "Targets:", and "Excluded Regions:". The "Product Size Ranges" field is set to "900-1000" and is also circled in red.

Other settings include:

- 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
- Pair Max Template Mispriming: 24.00

Buttons for "Pick Primers" and "Reset Form" are visible again.

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, Concentration of dNTPs: 0.0

The Windows taskbar at the bottom shows the system clock as 14:23 on 21.09.2018.

6. Выписать в файл с исходной последовательностью наиболее оптимальные праймеры (прямой и обратный), их температуры плавления и последовательность ПЦР-продукта (указать его длину).

```
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len  tm    gc%  any  3' seq
LEFT PRIMER 9      22  59.20 36.36 6.00  2.00 TCATTGCGATATGAGCATGTAA
RIGHT PRIMER 988    20  60.53 45.00 7.00  3.00 ACCGATTCTATGCCCCATT
SEQUENCE SIZE: 1010
INCLUDED REGION SIZE: 1010

PRODUCT SIZE: 980, FAIR ANY COMPL: 4.00, FAIR 3' COMPL: 2.00

1 GTTGTGTCATTGCGATATGAGCATGTAACTTTGAACTCCGAATACTGTTAICTTTC
   >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
61 ATTCTTAGGTAAGGATCTATTAGATTTATCAAGAGTAGAAGTTGACAAACAAGTT
121 TCAAAAATTTGACAATTTTAAAAGGCCGCCAACAAGCACAGCACATCAACTGTTGATC
181 GTCTAGATCCATCTATACTGAAACAAATATCTACAAAATACATGCCGGATTGACTGCTA
241 AAGTTTTCCGTACATATAATGCTTCCAAAAAATGCAAGATCAACTGGATCTAATCCAA
301 ATAAGGATCTGTCCGAGAAAAATTAAGTACAACGACAGCAATAGAACTGTAGCCA
361 TCCTATGTAACCATCAAAGGACTGTACGAAAGGGCATGCACAAACAGTGGAAAGGCCA
421 ATAATAGAATACAAGAGTGGAAATGGCAAAAGATTCTGTGAAGAGGGCCATTTACAAT
481 TGGATAAGGATCTTTTAAAGAAAGAGCCAAAATATTTTGAAGAAATCGACGATTTGACGA
541 AAGAAGATGAAGCCACCAATCACAGAGAAATTATTGATAGAGAAATTGAAAATATCGCC
601 GAAAATTTGTAGGGAGAACGATAAGAGGAAATTTGAAAAGGAAGAAATTAITGCCGAAA
661 GTCAATTGAAGGAATGGTTGGAGAAAGTCGACGAAAAGAACAAGAATTCGAAAAGGAAT
721 TGAAAACCGGTGAAGTGGAACTGAAATCAAGTTGGAATTCAGTCGAAAATAAAAAGCAC
781 AAGTAGAGAAATTAGAACGCGTATCCAAACTAGTCCATTCAGTTGAAAGATAAAGAGG
841 AAACTCCCAGTTTCACTGGSCATTTCCAAATCAATATAATAGACCCTAGACTTCTG
901 TGGTATTTGCAAAAGATGATGTTCCGATGAAAAGATTTTACAAAACCCCTAAGAG
961 AAAAAATTCAAATGGCCATAGAATCGGTAGATGAAAATGGAGTTTAA
   <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

KEYS (in order of precedence):
>>>>>> left primer
<<<<<<< right primer
```

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) 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'. There are 'Pick Primers' and 'Reset Form' buttons. Below the form, there are fields for 'Sequence Id.', 'Targets', 'Excluded Regions', and 'Product Size Ranges'. Further down, there are 'Number To Return', 'Max 3' Stability', 'Max Repeat Mispriming', and 'Pair Max Repeat Mispriming' settings. At the bottom, there are 'General Primer Picking Conditions' including '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 application icons.

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.