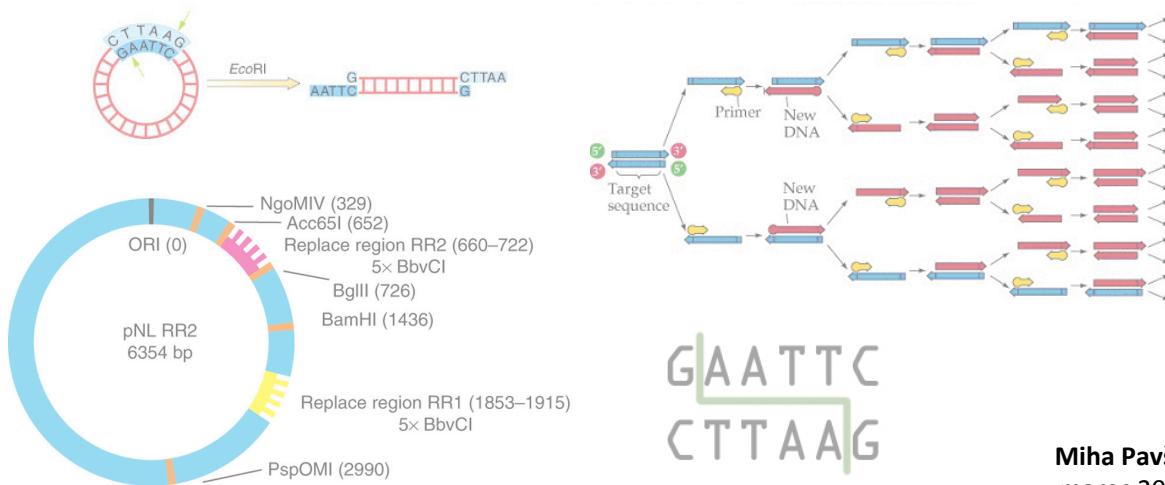


5. vaja

Analiza nukleotidnih zaporedij in molekulsko kloniranje



5. vaja: Analiza nt zaporedij in mol. kloniranje

Pregled vaje

- **raba kodonov**
 - aplikacija tabel rabe kodonov na heterologne gene
- **restriktijske endonukleaze (restriction endonucleases, restriction enzymes)**
 - iskanje mest (linearna, krožna dsDNA)
- **plazmidne karte (plasmid maps)**
- **verižna reakcija s polimerazo (PCR, polymerase chain reaction)**
 - matrica
 - načrtovanje začetnih oligonukleotidov
 - ohranitev bralnega okvirja

v obliki kviza v
spletni učilnici

Raba kodonov

Pri nekaterih organizmih se nekateri kodoni za določen ak-ostanek pojavljajo pogosteje kot drugi kodoni za isti ak-ostanek.

- velja predvsem za **hitro rastoče organizme** (→ optimizacija rabe kodonov)
 - višja hitrost in natančnost translacije
 - najbolj izrazita je v genih, ki se močno izražajo
 - raba kodonov povezava s količino tRNA za določen ak-ostanek!
 - pri počasi rastočih organizmih (npr. *Homo sapiens*) ali pri organizmih z majhnimi genomi optimizacija rabe kodonov ni izrazita

Problem v praksi:

- pri organizmu Y je raba kodonov optimirana, pri organizmu X pa ne (oz. je drugačna)
 - v organizmu Y želimo izraziti gen iz organizma X (*heterologno izražanje*)

↓ pomanjkanje določene/ih tRNA

- počasnejša translacija
 - napake pri translaciji
 - prehitra prekinitev translacije → skrajšane oblike proteina

Raba kodonov

Primer: raba kodonov pri *Escherichia coli* K12.

Od šestih kodonov za Arg se le dva (CGU in CGC) uporabljata pogosto.

UUU	F	0.57	19.7	UCU	S	0.11	5.7	UAU	Y	0.53	16.8	UGU	C	0.42	5.9
UUC	F	0.43	15.0	UCC	S	0.11	5.5	UAC	Y	0.47	14.6	UGC	C	0.58	8.0
UUA	L	0.15	15.2	UCA	S	0.15	7.8	UAA	*	0.64	1.8	UGA	*	0.36	1.0
UUG	L	0.12	11.9	UCG	S	0.16	8.0	UAG	*	0.00	0.0	UGG	W	1.00	10.7
CUU	L	0.12	11.9	CCU	P	0.17	8.4	CAU	H	0.55	15.8	CGU	R	0.36	21.1
CUC	L	0.10	10.5	CCC	P	0.13	6.4	CAC	H	0.45	13.1	CGC	R	0.44	26.0
CUA	L	0.05	5.3	CCA	P	0.14	6.6	CAA	Q	0.30	12.1	CGA	R	0.07	4.3
CUG	L	0.46	46.9	CCG	P	0.55	26.7	CAG	Q	0.70	27.7	CGG	R	0.07	4.1
AUU	I	0.58	30.5	ACU	T	0.16	8.0	AAU	N	0.47	21.9	AGU	S	0.14	7.2
AUC	I	0.35	18.2	ACC	T	0.47	22.8	AAC	N	0.53	24.4	AGC	S	0.33	16.6
AUA	I	0.07	3.7	ACA	T	0.13	6.4	AAA	K	0.73	33.2	AGA	R	0.02	1.4
AUG	M	1.00	24.8	ACG	T	0.24	11.5	AAG	K	0.27	12.1	AGG	R	0.03	1.6
GUU	V	0.25	16.8	GCU	A	0.11	10.7	GAU	D	0.65	37.9	GGU	G	0.29	21.3
GUC	V	0.18	11.7	GCC	A	0.31	31.6	GAC	D	0.35	20.5	GGC	G	0.46	33.4
GUA	V	0.17	11.5	GCA	A	0.21	21.1	GAA	E	0.70	43.7	GGA	G	0.13	9.2
GUG	V	0.40	26.4	GCG	A	0.38	38.5	GAG	E	0.30	18.4	GGG	G	0.12	8.6

kodon za posamezni ak-ostanek
enočrkovna koda ak-ostanka

kodon ak xxx yyy

1

- frekvenca na 1000 kodonov (za vse ak)

- frekvenca rabe tega kodona (za to ak)

Raba kodonov

Primerjava: raba kodonov za Arg pri *Escherichia coli* K12 in človeku.

CGU	R	0.36	21.1
CGC	R	0.44	26.0
CGA	R	0.07	4.3
CGG	R	0.07	4.1
AGU	S	0.14	7.2
AGC	S	0.33	16.6
AGA	R	0.02	1.4
AGG	R	0.03	1.6

E. coli K12

Izrazita preferenca za dva kodona!

CGU	R	0.08	4.5
CGC	R	0.18	10.4
CGA	R	0.11	6.2
CGG	R	0.20	11.4

AGU	S	0.15	12.1
AGC	S	0.24	19.5
AGA	R	0.21	12.2
AGG	R	0.21	12.0

Homo sapiens (standardni kod)

Ni izrazite preference!

kodon za posamezni ak-ostanek kodon ak XXX YYY frekvenca na 1000 kodonov (za vse ak)
 enočrkovna koda ak-ostanka frekvenca rabe tega kodona (za to ak)

Raba kodonov

Vaja:

- ogled rabe kodonov pri različnih organizmih
 - primerjava rabe kodonov v določenem genu iz nekega organizma z rabo kodonov v drugem organizmu

Codon Usage Database

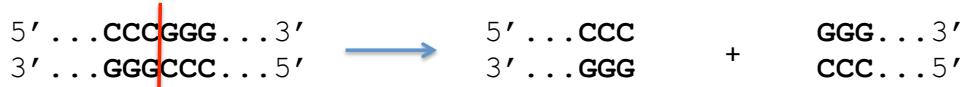


<http://www.kazusa.or.jp/codon/>

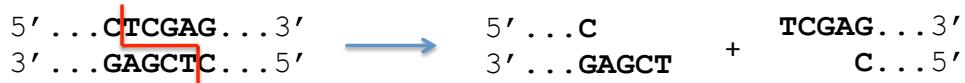
<http://gcua.schoedl.de>

Restriktivne endonukleaze

- prepozna določeno mesto na DNA (**restriktivno mesto**, *restriction site*) in ga razrežejo
 - **topi** konci (*blunt ends*), npr. *Smal*



- **lepiljivi** koncu (*sticky ends*), npr. *Xhol*



- zaporedja pogosto **palindromna**
- imena restriktivnih endonukleaz izvirajo iz imen (mikro)organizmov, iz katerih so bile izolirane, npr. *EcoRI* – *Escherichia coli*
- ti encimi so izredno uporabni pri molekulskega kloniranju – usmerjeno sestavljanje fragmentov DNA (npr. vstavljanje vključka v plazmidni vektor)

Restriktivne endonukleaze

Vaja:

- restriktivna analiza (*restriction analysis*) plazmidnega konstrukta

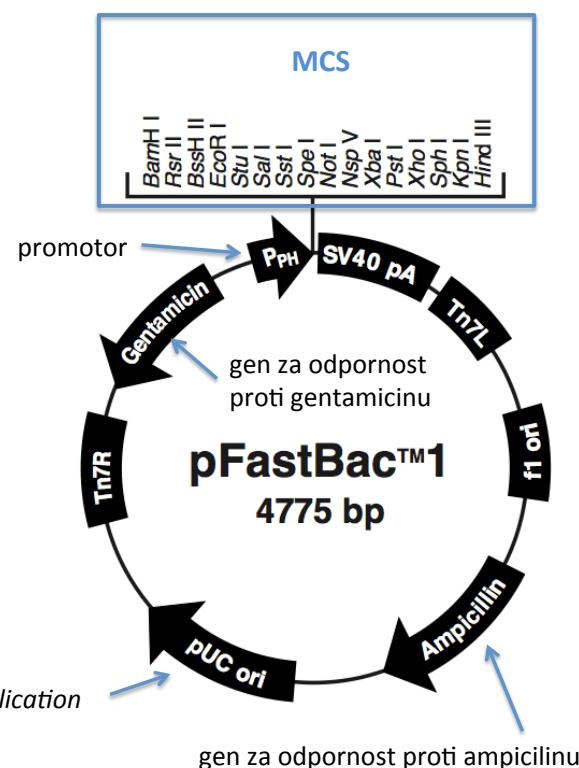


<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

Plazmidne karte

S plazmidnimi kartami **grafično ponazorimo lokacijo in obseg določenih regij plazmida:**

- geni za odpornost proti antibiotikom
- ori (*origin of replication*)
- promotorji
- ...
- vključki
- multiplo klonirno mesto (MCS, *multiple cloning site*) – sem ponavadi vstavljamo vključke preko prepoznavnih mest za restriktijske endonukleaze

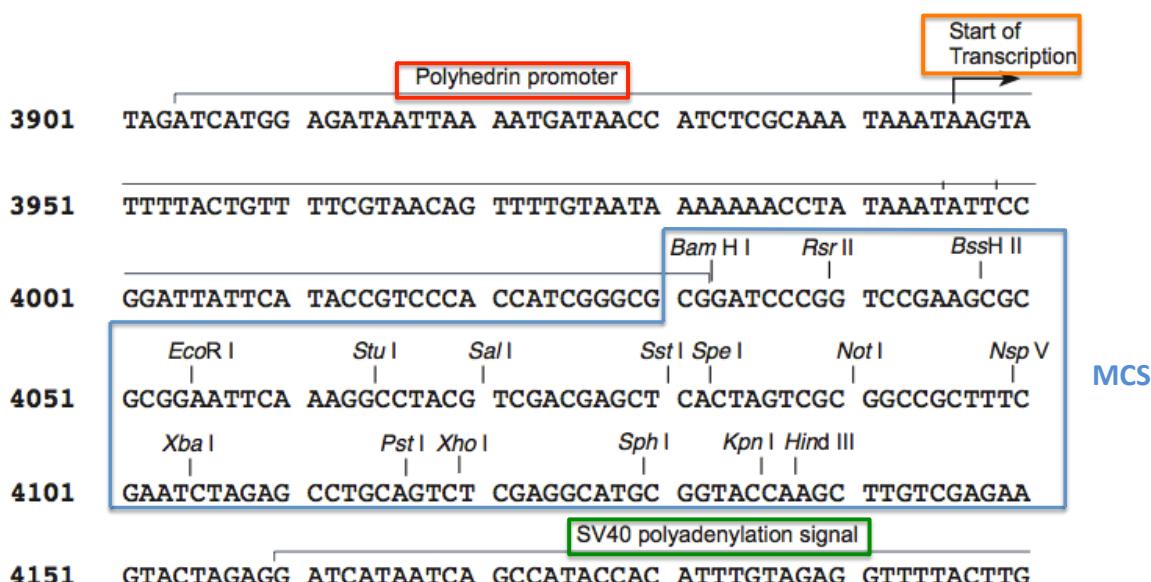


Plazmidne karte

Multiplo klonirno mesto

Primer vektorja za izražanje proteinov v insektnih celicah: pFastBac 1.

Vključek z genom, ki ga želimo izraziti, vstavimo preko mest od *Bam*H I do *Hind*III (vključek mora imeti START in STOP kodon!).

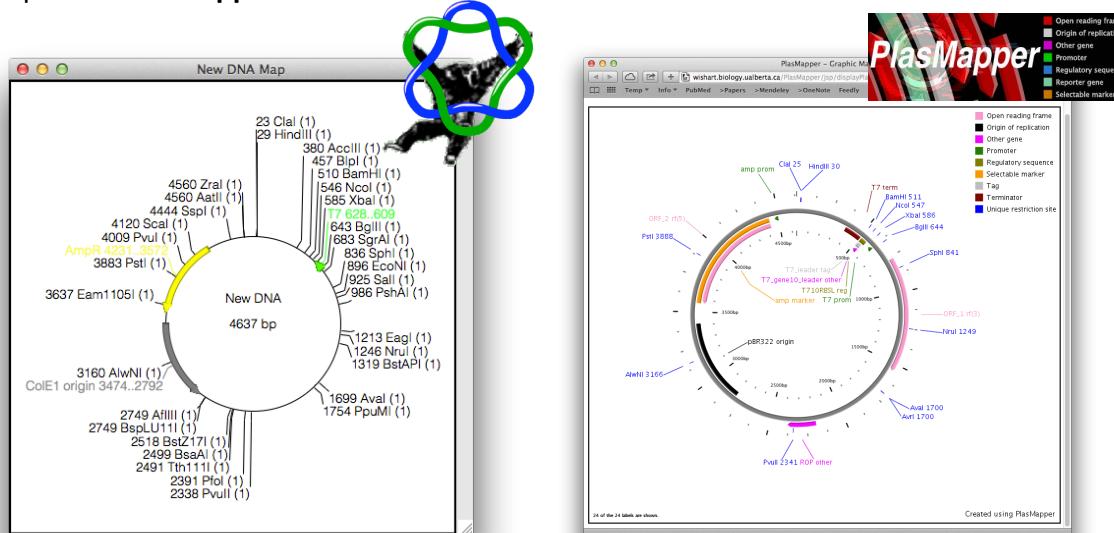


Plazmidne karte

Risanje plazmidnih kart

Primer programov za risanje plazmidnih kart:

- lokalno nainstaliran – **ApE** (A plasmid Editor)
- spletni - **PlasMapper**



<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>

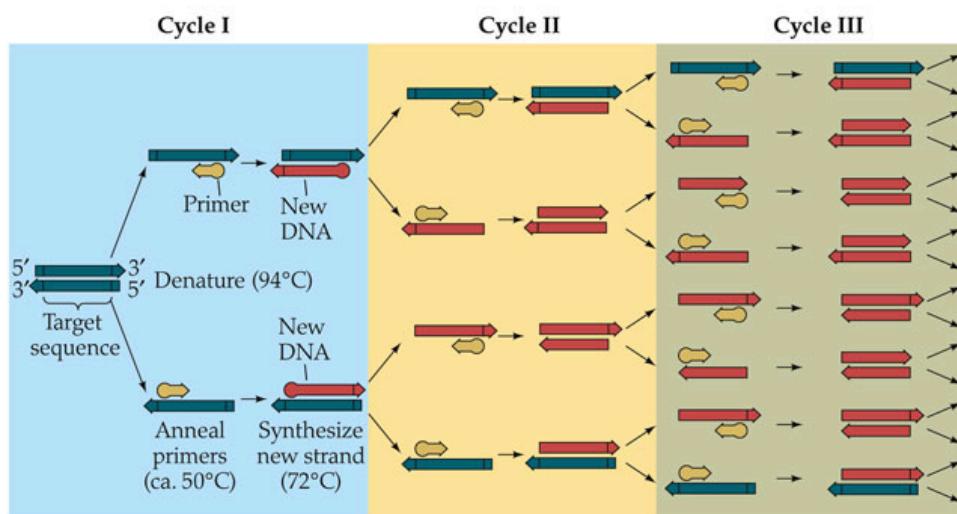
<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>

Povezavi do teh orodij sta tudi na wiki **Povezave**.

Veržna reakcija s polimerazo (PCR)

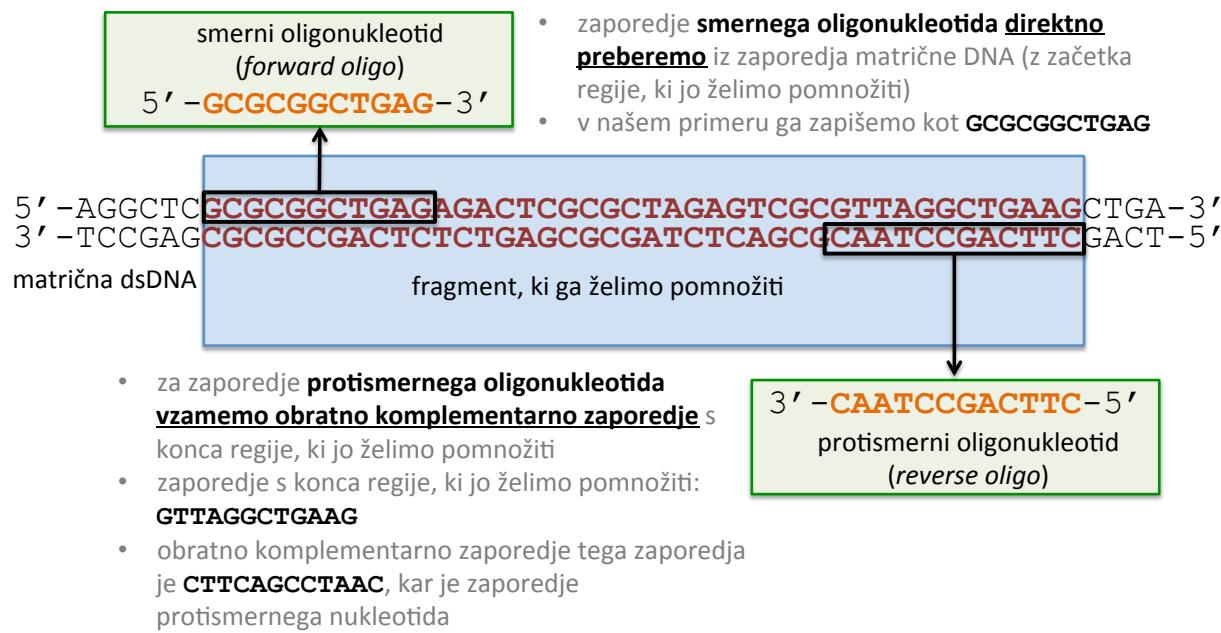
Osnove

- pomnoževanje (fragmentov) DNA
 - kloniranje, uvajanje mutacij
 - detekcija DNA
 - določanje zaporedij (sekvenciranje)
 - kvantifikacija nukleinskih kislin
 - ...
- reakcijska zmes vsebuje:
 - matrična DNA
 - par začetnih oligonukleotidov
 - zmes dNTP
 - termostabilna DNA-polimeraza (npr. *Taq*)
 - reakcijski pufer



Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Načrtovanje začetnih oligonukleotidov



Na 5'-konci oligonukleotidov lahko dodamo druga zaporedja, ki niso komplementarna matrici (npr. restriktivna mesta za usmerjeno vstavljanje v plazmidne vektorje) → ta zaporedja potem dobimo v končnem PCR produktu.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Splošne smernice za izbiro optimalnih začetnih oligonukleotidov:

- dolžina 20-25 nt
- temperatura tališča (T_m) 55-70°C → pomembno za prileganje (*annealing*), na splošno velja $T_a = T_m - 5$ °C
- večji delež GC → višja T_m
- oligonukleotidi naj med seboj ne tvorijo dsDNA:
 - sekundarne strukture (regije dsDNA znotraj istega oligonukleotida)
 - dimeri oligonukleotidov (regije dsDNA med dvema oligonukleotidoma)
- na 3'-koncu naj bo G ali C (tri vodikove vezi v bp – stabilnejše!)
 - 3'-konec mora tvoriti par z matrico, sicer ne pride do polimerizacije
- specifičnost samo za izbrano DNA (uravnavamo tudi s T_a)

Izračun T_m

Za kratke oligonukleotide, < 14 nukleotidov, v prisotnosti 50 mM soli

$$T_m = 4 \text{ } ^\circ\text{C} \times (\text{število G in C v oligonukleotidu}) + 2 \text{ } ^\circ\text{C} \times (\text{število A in T v oligonukleotidu})$$

Za daljše oligonukleotide (N je dolžina oligonukleotida)

$$T_m = 64.9 \text{ } ^\circ\text{C} + 41 \text{ } ^\circ\text{C} \times (\text{število G in C v oligonukleotidu} - 16.4)/N$$

Za daljše oligonukleotide ob upoštevanju koncentracije soli

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \text{ } ^\circ\text{C} \times (\log_{10}[\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + 0.41 \text{ } ^\circ\text{C} \times (\% \text{GC}) - 675/N$$

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Potek PCR (poenostavljen primer): vezava začetnih oligonukleotidov

5' -AGGCTC**GCGCGGCTGAGAGACTCGCGTAGAGTCGCGTTAGGCTGAAG**CTGA-3'
3' -TCCGAG**CCGCCGACTCTCTGAGCGCGATCTCAGCGCAATCCGACTTC**GA
CT-5'

matrična dsDNA

 **95°C - denaturacija**
(verigi matrične dsDNA se ločita)

5' -AGGCTC**GCGCGGCTGAGAGACTCGCGCTAGAGTCGCCTAGGCTGAAGCTGA**-3'

3' - TCCGAG**CGCGCCGACTCTCTGAGCGC**ATCTCAGCGCAATCCGACTTCGACT-5'

~55°C (T_a) – vezava začetnih oligonukleotidov
(annealing, prileganje; optimalno T_a izračunamo iz T_m)
[temperaturo hitro znižamo s 95°C, da ne nastane matrična dsDNA]

5' -AGGCTC**GCGCGGCTGAGAGACTCGCGCTAGAGTCGGTTAGGCTGAAG**CTGA-3'
 3' -**CAATCCGACTTC**-5'

smerni oligonukleotid (*forward oligo*)

' -CAATCCGACTTC-5'
protismerni oligonukleotid
(*reverse oligo*)

5' - **GCGCGGCTGAG** - 3'
 3' - TCCGAG**CGCGCCGACTCTTGAGCGCGATCTCAGCGCAATCCGACTTC** GACT - 5'

 (se nadaljuje)

5. vaja: Analiza pt zaporedii in mol. kloniranje

Verižna reakcja s polimerazo (PCR)

Potek PCR (poenostavlien primer): polimerizacija

↓ ~72°C - polimerizacija
(ta temperatura je optimalna za delovanje termostabilnih DNA-polimeraz)

5' -AGGCTC**GCGCGGCTGAGAGACTCGCGTAGAGTCGCGTTAGGCTGAAG**CTGA-3'
 CTCAGCG**CAATCCGAC**TTCTTC-5'

smerni oligonukleotid (*forward oligo*)

protismerni oligonukleotid
(*reverse oligo*)

5' - **GCGCGGCTGAGAGACTCG** →
 3' - TCCGAG**CCGGCCGACTCTTGAGCGCGATCTCAGCGCAATCCGACTTC**GACT-5'

1

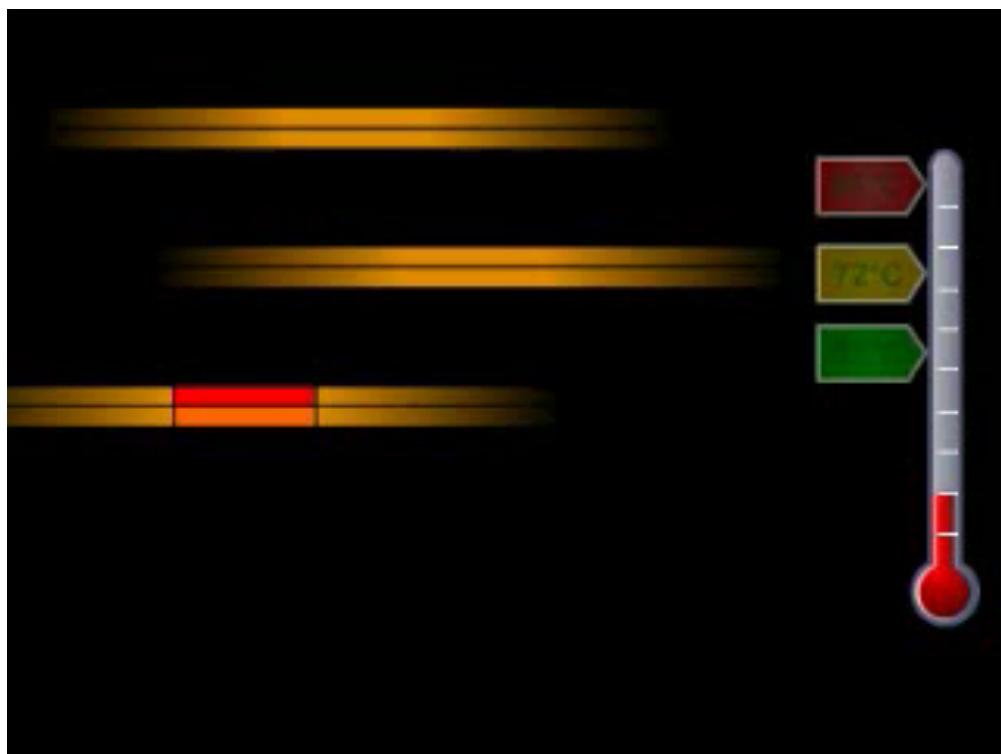
5' -AGGCTC**GCGCGGCTGAGAGACTCGCGTAGAGTCGCGTTAGGCTGAAG**CTGA-3'
 ..AG**CGCGCCGACTCTCTGAGCGCGATCTCAGCGCAATCCGACTTC**-5'

5' - **GCGCGGCTGAGAGACTCGCGTAGAGTCGCCTAGGCTGAAG**CT.
 3' - TCCGAG**CCGGCCGACTCTCTGAGCGCAGTCAGCGCAATCCGACTTC**GA
 GACT-5'

ciklično ponavlanie (ponavadi 20-30x):

- ponovna denaturacija (95°C)
 - vezava začetnih oligonukleotidov (T_a)
 - polimerizacija (72°C)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)



Vir: YouTube (https://www.youtube.com/watch?v=eEcy9k_KsDI)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Vaja:

- načrtovanje začetnih oligonukleotidov – samostojno
 - identifikacija regije, ki jo želimo pomnožiti
 - izpis zaporedij oligonukleotidov in analiza njihovih lastnosti (T_m , dimeri, ...)
 - načrtovanje začetnih oligonukleotidov z orodji (Primer3, Primer-BLAST)
 - identifikacija regije, ki jo želimo pomnožiti
 - ustrezna nastavitev parametrov → program sam predlaga optimalne oligonukleotide

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Name
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Sequence Backslash Delimited	Length	Molar Weight	G-C content	Tm	Tm (Basic)	Tm (Adj)	Tm (Nearest neighbor)
<input type="text" value="Backslash Delimited"/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>
<input type="checkbox"/> Rev Complement Strand to 2D tRNA <input type="checkbox"/> 5' modification (any) <input type="checkbox"/> 3' modification (any) <input type="checkbox"/> 10 μM Primer <input type="checkbox"/> 1 mM Salt (Na ⁺)				<input type="checkbox"/> Selected molecule <input type="checkbox"/> tRNA			
<input type="button" value="Calculate"/> <input type="button" value="Swap Strands"/> <input type="button" value="BLAST"/> <input type="button" value="mfold"/>							
Physical Constants Length: <input type="text" value=""/> Molar Weight: <input type="text" value=""/> G-C content: <input type="text" value=""/> Tm: <input type="text" value=""/> °C (Basic) 1 mol of s with an Absorbance of <input type="text" value=""/> at 260 nm 1 mol of s is <input type="text" value=""/> nucleotides & contains <input type="text" value=""/> micrograms. Tm: <input type="text" value=""/> °C (Adj Adjusted) Tm: <input type="text" value=""/> °C (Nearest neighbor)							
Thermodynamic Constants/Conditions T = <input type="text" value=""/> K; NaCl at 20°C; pH <input type="text" value=""/> ; μ = <input type="text" value=""/> M							
Rev/RK	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>
Wt/Wt	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>	<input type="text" value=""/>
Computed Statistical Properties Calculations 1. <input type="checkbox"/> Minimum base pair required for single primer self-dimerization 2. <input type="checkbox"/> Minimum base pairs required for primer hairpins							
<input type="checkbox"/> Check Self-Complementary							

[http://
www.basic.northwestern.edu
u/biotools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)

Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence.

disclaimer	code of conduct
Select the Task for primer selection: <input type="text" value="generic"/> <input style="width: 20px; height: 15px; vertical-align: middle;" type="button" value="..."/>	
Paste source sequence below (3'-5'': string of ACCTTNaacgt -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-cut undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a Mispriming library (repeat library) : <input type="text" value="NONE"/>	
<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 (3' to 5' on opposite strand)	
<input style="width: 150px; height: 30px; vertical-align: middle;" type="button" value="Get Primers"/>	

<http://primer3.ut.ee>

Primer-BLAST A tool for finding specific primers.

► NCBI Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

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

PCR Template

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

Or, upload FASTA file [Choose File](#) | no file selected

Primer Parameters

Use my own forward primer
(5'-3' > plus strand)
Use my own reverse primer
(3'-5' > minus strand)

PCR product size
of primers to return

Min Max

70 1000

5

Min Opt Max

57.0 60.0 63.0 5

Primer melting temperatures [°C]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
(primerjanje zaporedij oligonukleotidov z bazami zaporedij nt – za zmanjšanje nespecifične vezave)