

Metody przesiewowe w wykrywaniu autoryzowanych i nieautoryzowanych GMO – wykrywanie promotora 35S

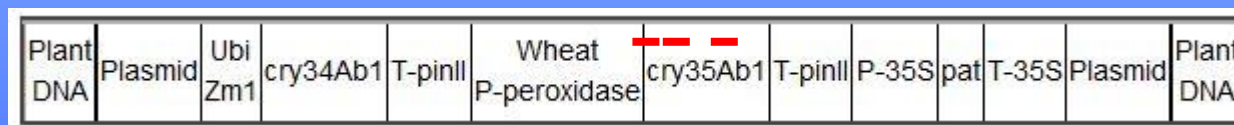
dr Jarosław Cieśla
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

PCR jako metoda wykrywania i oznaczania GMO

1. specyficzna do linii - zwykle jej elementy są **zlokalizowane** na styku wstawki z DNA gospodarza.



2. specyficzna do transgenu - wykrywa złączenie elementów genetycznych we wstawce, nie rozróżnia linii modyfikowanych taką samą wstawką.



3. przesiewowa - wykrywa element wspólny dla wielu linii, służy do wykrywania obecności GMO w ogóle, ewentualnie do oznaczenia ich ogólnej ilości w próbce, bez identyfikacji.



Najczęściej wykorzystywane w badaniach przesiewowych elementy genetyczne

1. promotor genu 35S RNA z wirusa mozaiki kalafiora (P35S)
2. terminator genu syntazy nopaliny z plazmidu Ti *Agrobacterium tumefaciens* (tNOS)

83 ze 102 autoryzowanych linii GMO ma jeden z tych elementów albo obydwa

67 ze 102 ma P35S

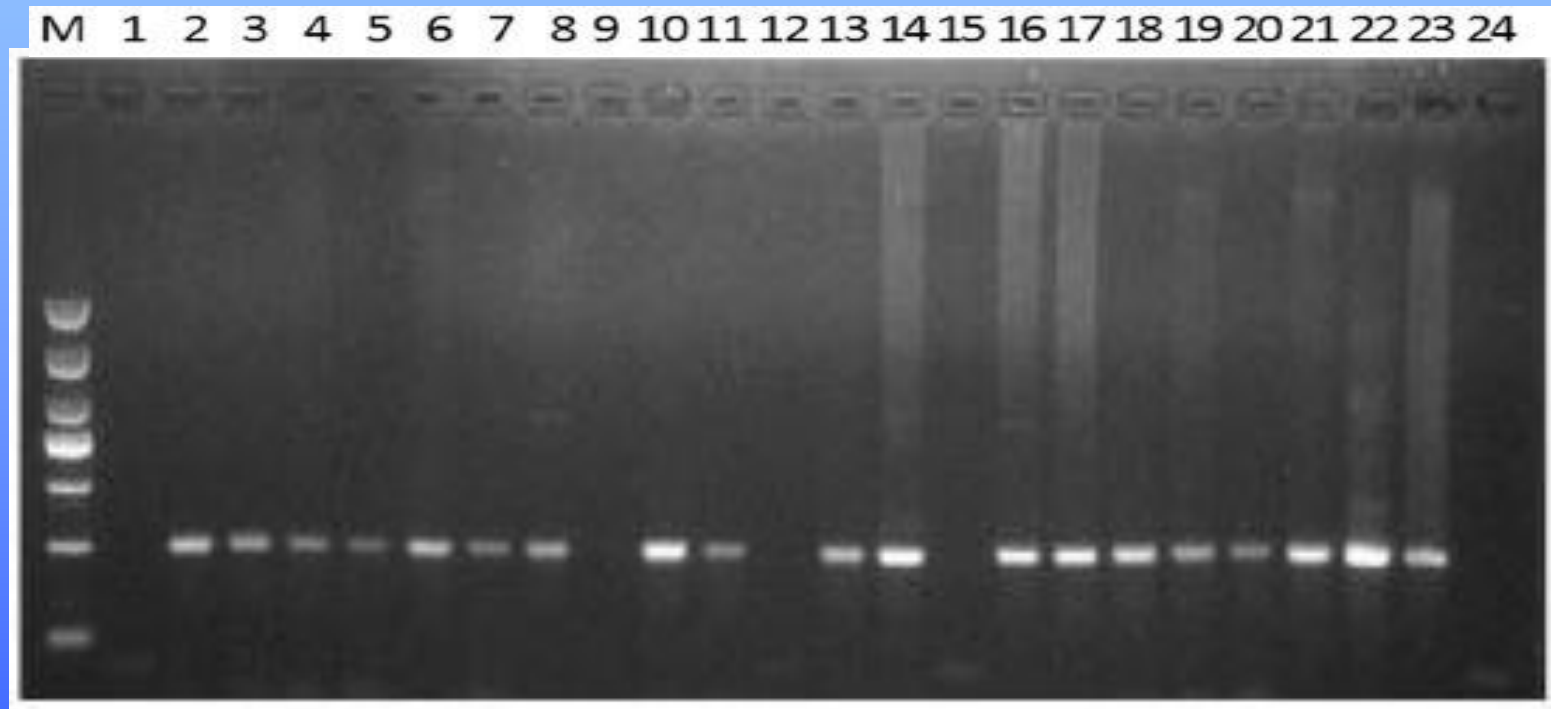
55 ze 102 ma tNOS

Wśród 28 istotnych komercyjnie linii modyfikowanej kukurydzy tylko 1 nie ma P35S, z 16 linii rzepaku tylko 2.

Dlatego P35S jest najczęściej wykorzystywany do badań przesiewowych

Wykrywanie P35S

W 2014 roku w bazie danych GMDD było 37 metod wykrywania i oznaczania P35S. Żadna z nich nie wykrywała wszystkich linii zawierających ten promotor. Najlepsza dała 4 fałszywie negatywne wyniki na 23 linie zawierające P35S.



1. Sekwencja P35S nie jest identyczna we wszystkich liniach.
2. Jest elementem różnych wstawek pochodzących z różnych plazmidów.
3. Niektóre wstawki zawierają 2 jego kopie, czasem różniące się od siebie.

Projektowanie metody

Tylko 3 metody z 2014 roku zlokalizowano w konserwowanym regionie P35S

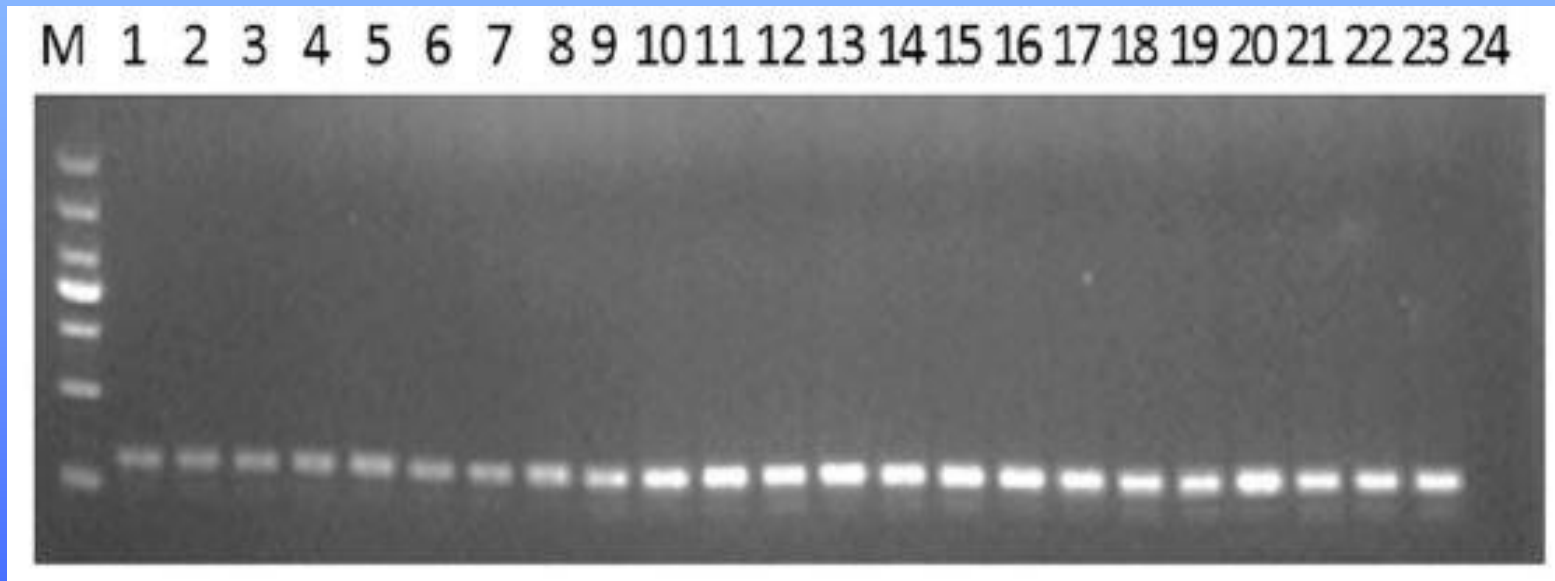
Wszystkie mają startery czy sondy w miejscach albo dużej zmienności, albo jednonukleotydowych mutacji

| | (51) | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 188 | |
|-----------------------|------|--------------------------------|----------------------|---------|---|---|--------------------|------------------------|---------------------------|-----|-----|-----------------------|-----------------|-------------|--|
| CMV 7148-7342_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| T25-35S2_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| TC1507_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| Bt11-35S1_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| Bt11-35S2_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| MON863_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| MON89034_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| GTS-403-2_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| MON1445_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| LLcollan25_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| MON531-35S2_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| Kefeng6_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| KMD_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| pCambia1381_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| pMCG1161_clipseq | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATCGTTG | AAGAT | --GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | | |
| M2F_clipseq | (1) | | | | | | CGACAGTGGTCCCAAAGG | | | | | | | | |
| M2P_clipseq | (1) | | | | | | | | TGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC | | | | | | |
| M2R_clipseq | (1) | | | | | | | | | | | GAAGACGTTTCAACCACGCTT | | | |
| M7F_clipseq | (1) | GA | ATTGCGATAAAGGAAAGGCC | | | | | | | | | | | | |
| M7P_clipseq | (1) | | | ATCGTTG | AAGAT | GCCTCTGCCGACA | | | | | | | | | |
| M7R_clipseq | (1) | | | | | | GGTCCCAAAGATGGACCC | | | | | | | | |
| M12F_clipseq | (1) | | | | | GCCTCTGCCGACAGTGGT | | | | | | | | | |
| M12P_clipseq | (1) | | | | | | | CAAAGATGGACCCCCACCCACG | | | | | | | |
| M12R_clipseq | (1) | | | | | | | | | | | GAAGACGTTTCAACCACGCTT | | | |
| M25F(35SEF)_clipseq | (1) | CATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | | | | | | | | | | | | | |
| M25R(35SER)_clipseq | (1) | | | | | | | | | | | | TCCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | |
| M25P(35SEP)_clipseq | (1) | | | | | | | | GACCCCCACCCACGA | | | | | | |
| Consensus | (51) | AAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCC | ATC | TT | AAGAT | GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTCAACCACGCTTTC | AAAGCAAGTGG | | | | | | | | |

W przypadku niezgodności można uzyskać wynik albo mocno niedoszacowany, albo nawet fałszywie negatywny

Sprawdzenie metody

Metoda używająca elementów starannie zlokalizowanych w miejscach wspólnych dla wszystkich linii wykryła je wszystkie, z podobną wydajnością.



Jest to przykład sytuacji, która zmusza do opracowania własnej metody wykrywania i oznaczania jakiejś linii.

Dobrze więc jest wiedzieć jak się za projekt wziąć.

Przydatne linki

Baza danych roślin modyfikowanych genetycznie
Center for Environmental Risk Assessment

<http://cera-gmc.org/GMCropDatabase>

CERA's database of safety information includes not only plants produced using recombinant DNA technologies (e.g., genetically engineered or transgenic plants), but also plants with novel traits that may have been produced using more traditional methods, such as accelerated mutagenesis or plant breeding. These latter plants are only regulated in Canada.

**Bazy danych metod wykrywania i oznaczania
GMO**

1. Institute for Health and Consumer Protection (JRC-IHCP), Ispra, Włochy
2. GMO Detection method Database (GMDD)

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>

<http://gmdd.shgmo.org/index/search>

**Narzędzie do zestawiania sekwencji
(alignment)**

Clustal Omega: Multiple Sequence Alignment

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

**Narzędzie do projektowania
starterów i sond**
PrimerQuest

<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Inde>

[x](#)

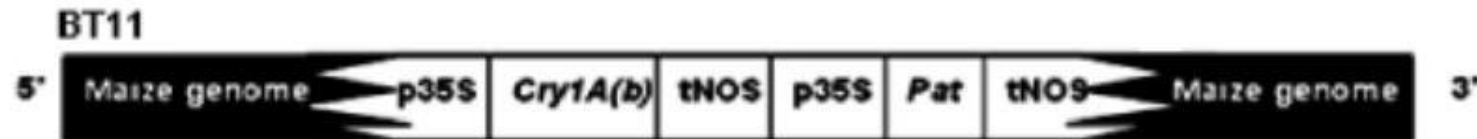
**Narzędzie do sprawdzania „ręcznie”
projektowanych starterów i sond**
OligoAnalyze

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

Sekwencja wstawki

<http://gmdd.shgmo.org/event/view/59>

Introduced Elements



All Known Sequence:

(1)

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------|-------|---------------|--------|-----|---------|-------|---------------|-----|----------|---------|-----------|
| | | | | | | | ref: | AY123624 | | AY629236 | | |
| Plant DNA | Plasmid | P35-S | adh1 enhancer | cry1Ab | nos | plasmid | P-35S | adh1 enhancer | pat | nos | plasmid | Plant DNA |

Sequence Illustration

1 - 11 Plant DNA
 12 - 1101 Plasmid
 1102 - 1600 P35-S
 1601 - 2107 adh1 enhancer
 2108 - 3954 cry1Ab
 3954 - 4217 nos
 4218 - 4648 plasmid
 4649 - 5187 P-35S
 5188 - 5377 adh1
 enhancer
 5378 - 5933 pat
 5934 - 6196 nos
 6197 - 6348 plasmid
 6349 - 6553 Plant DNA

Projektowanie

> Btlline

> 11,1101,1600,2107,3954,4217,4648,5187,5377,5993,6196,6348,6353

TATCATGCACTTGCAATGACAAAATCCCTTAAAGTGTAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGAGATCGTTTTTTTTCTGCGCSTAAATCTGCTGCTTGGAAACAAAAAACCACCG
CTACCAGCGGSGTTHGTTTCCGGGATCAAGAGCTACDAACTCTTTTCCGGAAGTAACTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACCTGCTTCTCAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACCTCTGTAGCACC
GCTACATACCTCGCTCTGTAACTCTGTACCAGTGGCTGGTGCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCSCAGCGCTCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGC
CCAGCTTGGAGGGAACGACTACACGAACTGAGATACCTACAGCGGTGAGCAATGAGAAAGCGCCACCGCTTCCGGAAGGAGAAAGCGGACAGGTAATCCGCTAAGCGGACGGTGGGAAACAGAGCGCCAGCGGGGCTT
CGAGGGGAAACCGCTGATATCTTATACCTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCTGAAATTTTTGTGATCTCTGTCAGGGGGCGAGGCTATGGAAAACGCCAGCAACCGCGCTTTTTACGGTTCTCTGGCTT
TTGCTGGCTTTTGGTCAATGTTCTTCCCTGGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAATGAGCTGATACCGCTCCCGGAGCCCAACGACCGGAGCGGAGCTCACTGACCGAAGGAAAGCGGAAG
AGCGCCCATACGCAAAACCGCTCTCCCGGGGCTGGGCGGATGATCAATTAATGTCAGCTGGSCAGCACTGGTTTCCGCGAGCTGGAAAGGGTGCAGGATTTGGTGGAGCTCAAGGATCAATGGGTGCGACTGAAACCGCAGCAGATTGGAAAGGDTACAGTACACACACATGTAT
TTACACTTFAATGCTTCCGGCTCTGTATGTTTGTGGAAATGTTGAGGGATAAACAATTTACACAGGAAACACTATGATCATGATTAAGAAATCCAGCTGCTGTCAGAACACCAAGAGGCTATTAGACTTTTTCAAAGAGGTTAA
TATCGGGAAACCTCCCTGGATFCCATTGGCCAGCTATGCTGCACTTCAAGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCACAAATGCCATCAATGGGATAAAGGAAAGGCTATGTTCAAGATGCGCTCTACCGACAGTGGT
CCGAAAGATGCAACCCCAACGAGGAAACATGCTGAAAGAGAGACTTCCAAACAGCTCTTCAAAGCAATGGATTTGATGTAATCTCCACTGACGTAAGGATGACGCAAAATCCCACTATCTTCCCAAGCCCTTC
CTCTATATAAGAAAGTTCATTGGAGAGGACAGCTGAAATCAACAGTCTCTCTCAAAATCTATCTCTCTATTTTTCTCCATAAATGTTGAGTGTAGTTCCAGATAAGGGAAATAGGGTTCTTATAGGGTTTT
GCTCAGCTGTTGAGCATATAAGAAACCTCCGAGCTCGGTACGGGGGATCGGGAAAGGTTGCAGGATTTGGTGGAGCTCAAGGATCAATGGGTGCGACTGAAACCGCAGCAGATTGGAAAGGDTACAGTACACACACATGTAT
TATGATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCCTGGTATAATCACTGAGTAGTCAATTTATTACTTTGTTTTGACAACTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTTTCAGCTTGGAAATTTGGTTGCACCTGCACCTGG
TCTAATAACTGAGTAGTCAATTTATTACTGTTTGGACAAGTCAAGTAGCTCATGATCTGTCCCAATTTTTTCAGCTAGGAAGTTTGGTTGCACCTGGCTTGGACTAATAACTGATTAGTCAATTTATTACATTTGTTTGGACA
AGTCACTAGCTCATCCATCTGTCCCAATTTTCAGCTAGGAAGTTGGTGTGCACTGMAATTTGTGAACCCAAAGAGCCAAACAAGGCGCGGATCTCTAGAGTGGCCATGGCAACAACCCCAAACATCAACGATGCAATGCCA
TACAACCTCTGAGTAACCCAGAACTGAAAGTACTTGGTGGAGAACGCAATGAAACCGGTTACACTCCCATCGCACTCTCTCTGTCTTGGACACAGTTTCTCTCTCAGCGGATCTGTCCGAGGCTGCTGGGTTCTTCTCGGACT
AGTTGACATCAATFGGGGTAATCTTTGGTCCAFCTCAATGGTAGCATTTCCFGGTGCAATTTGAGCAGTGTGATCAACAGGAGATCGAGAGTTCCGCAAGNACAGCCACTCTCAGTTGGAGAGGATTGAGCAATCTCTACC
AAATCTATGGAGAGACTTCAGAGATGGGAAGCCGATCTCTACTAACCAGCTCTCCGGAGGAAAAGCGTATTCAATCAACGACATGAAACAGGCGCTTGACCAGCCTATCCCATTTGTTCCGAGCTCCAGAACTCCAAGTT
CCTCTCTTGTCCGTGTACGTTCAAGCAGCTAATCTCCACTCAGCGTGTCTTGGAGCGTTAGCGGTGTTGGGCAAGGTGGGGATTGGATGCTGCAACCATCAATAGCCGTTACAACGACCTTACTAGGCTGATTGGAAACTA
CACCGACCCAGCTGTTCCGTTGGTACAACACTGGCTTGGAGCGGTGCTCGGCTCCCTGATTTCTAGAGATTGGATTAGATAACAACAGTTGAGGAGAGAAATGACCCCTCACAGTTTGGACATTTGTGCTCTCTCCCGAACTATG
ACTCCAGAACCACCCTATCCGTFACAGTGTCCCAACTTACCAGAGAAATCTATACTAACCCAGTCTTGAAGAACTTCGACGGTAGCTTCCGTTGTTCTGCCCCAAGGTTATGAAAGGCTCCCATAGGAGCCCACTTTGATGGA
ATCTTTGAACAGCATAACTATCTACACCGATGCTCACAGGAGAGATTTACTGGTCTGGACAGGATCATGGCTCTCCAGTTGGATTGAGCGGGCCGAGTTTACGTTTCTCTCTATGGAACTATGGGAAAGCCGCGCTTC
ACAACAACGTTATCGTTGCTCAACTAGGTTAGGGTGTCTACAGAACTTTGTTCCACTTGTACAGAAAGACCTTCAATATCGGTATCAACAACAGCAACTTCCGTTCTTGAACGAAAGGAGTTCGCCATGGAACCTCTTT
CTAACTTGCCATCCGCTGTTTACAGAAAGAGCGGAACCGTTGATTCTTGGACGAAATCCCACACAGAAACAATGTTGCCACCCAGGCAAGGATTCTCCACAGGTTGAGCCACGTTGTCATGTTCCGTTCCGGATTCCAGC
AACAGTTCCGTTGAGCATCACTCAGAGCTCCTATGTTCTCATGGATTCACTGTAGTGTGAGTTCAACAATATCATTTCCCTTCTCAAATCACCCAAATCCCATTGACCAAGTCTACTAACTTTGGATCTGGAATCTGTGTCT
GAAAGGACCAGGCTTACAGGAGGTTGATATCTTAGAAGAATCTCTCCGGCCAGATTAGCACCCCTCAGAGTTAAATCACTGCACCACCTTCTCAAAGATATCGTGTGAGGATTCGTTACGCATCTACCACAACTTGAAT
TCCACACCTCCATTCGACGGAAGGCTATCAATCAGGTTAACTTCTCCGCAACCATGTCAAGCGGCGAGCACTTGCATTCGGGACGTTTCAAGTCCGGGACGTTTCAAGTCCGCTTCTTACGCACTTCAAGGATCAAGCGTTTTCT
ACCCTTAGCGCTCATGTTTCAATCTCTGGCAATGAAGTGTACATTTGACCCTATTGAGTTTGTGCTCCGGAAGTTACCTTCCAGGCTGAGTACTAGCAGATCAGGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTG
AATCTGTTGCGGGTCTTGGGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTAACATTTAATACGC
GATPAGAAAACAAAATATAGCGCGCAACCTAGGATAAATTAATCGCGCGGCTGTATCTATGTTACTAGATPCCAAAGCTTTGGCACTGGCGGTCTGTTTACAACGCTGTGACTGGGAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCC
TTGCAGCACAATCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAATAGCGAAGAGGCCCCGACCCGATCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGGCTGAAATGGCGAATGGCGCTGATCGGGATTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACAC
CGCATATGTTGCACTCTCAGTACAATCTGCTGTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCAAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
GAGCTGCAATGTTGTCAGAGGTTTTTCACCCTCATCACGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCAGATCCGAACATGGTGGAGCACGACACGCTTGTCTACTTCCAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGA
GACTTTTTCAACAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAG
ATGCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCAGGAGCATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCAGCTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGATGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCAC
TATCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACAGCTGAAATCACCAAGTCTCTCTTACAAATCTATCTCTCTATAAATAATGTGTGACTAGTTCCCGATAAGGGAATTAGGGTTTT
TATAGGGCTTCGCTCATGTTGTTGAGCATATAAGAAACCCCTACTCTAGCGAAGATCTCTTCACTCGCTGCTGCCACACCGAGCTTACTTCTGGGAGGCAAGGATCTAATCAGCCATCCCATTTGTGATCTTTGTGAGT
GATATGATACAAACTCGCGGTTGACTTGGCGCTTCTTGGCGCTTATCTGTCTCAGGGGAGACTCCGCTGTTCCCTCGEATCTCGACATGTCTCGGAGAGGAGACGTTGAGATTAGGCCAGTACAGCAGCTGATAT
GGCCGCGGTTTGTGATATCGTTAACCATTACATTTGAGACGTTACAGTGAACCTTAGGACAGAGCCACAAACACCACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGTTGCAAGATAGATAACCTTGGTTGGTTGCTGAGGTTGAGG
GTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGGGCTTGAAGGCTAGGAACGCTTACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTTGTCACATAGGCACTAAAGGTTGGGCTTAGGATCCACATTTGTACACATTTGCTTAAGTCT
ATGGAGGCGCAAGGTTTTAAGTCTGTGTTGCTGTTATAGGCTTCCAAACGATCCATCTGTTAGGTTGCATGAGGCTTTGGGATACACAGCCCGGGGTACATTCGCGCGCAGCTGGATACAAGCATGTTGGATGGCATGATGTT
TGGTTTTTGGCAAGGGAATTTGAGTGGCCAGCTCCTCAAGGCCAGTTAGGCCAGTTACCAGATCTGAGTGCAGCTGAGTTCAAACTTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCTGTTCCGGTCTTCCGCTTACGAT
GATTATCATATAAATTTCTGTTGAAATTTGAACTTAAAGTATAATTAACATGTAATGCATGAGCTTAATTTATGAGATGGGTTTTATGATAGTTAGTTAGTCCGCAATTAATACATTTAFCGCGATAGAAAACAAAATATAGCCG
CAAACTAGGATAAATATCCGCGCGGCTTCACTATGTTACTAGATTTAGGCTCTGTGATACGCTTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAAATAATGGTTTTCTTAGAGCTAGGTGGCATTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA
ACCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATCAAATATGATPCCGCTCATGGAGGGAATCTTGGATTTTTGGTGGAGACCAATTTGGTCTAAAATCTGTAGGTTTAGGCTCTAGTATTTATGAAAATGGTCTGCTCATGGC
TATTTTTCATCAAATATGGGGTGTGTGGCCATTTATCATGACCAGAGGCTCGTACACCTCACCCACATATGTTTCTTGGCATAGATTACATTTCTGGATTTCTGGTGGAAACCAATTTCTTGGTTAAAACCTCGTACGTT
TTAGCCTTCGGTATTATTGAAAATGGTCAATCATGGCTATTTTCCGCAAAATGGCGGTTGTGTGGCCCAATTTGA

Na co zwracać uwagę projektując

1. „CG clamp” czyli C lub G na 3'-końcu. Poprawia hybrydyzację w miejscu wiązania polimerazy.
2. T_m starterów i sondy nie powinny różnić się więcej niż o 2-3°C, ale mogą bo T_m są obliczane z dokładnością $\pm 2-3^\circ\text{C}$
3. Tworzenie struktur szpilki do włosów.
4. Tworzenie autodimerów.
5. Tworzenie dimerów z drugim starterem i sondą.

Bardziej niebezpieczne dimery mają wolne końce 5', bo polimeraza ma wtedy do czego się związać.

W punktach 3-5 ΔG powinna być większa niż - kilka kcal/mol (zazwyczaj $\Delta G > -10$ kcal na mol jest OK).

6. Unikać „traktów” GC. Dłuższe niż 3 mogą utrudniać hybrydyzację, czyli wybierać startery bez CCCC lub GGGG w sekwencji.

Analiza oligonukleotydów

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

Bt11_PPaF **5'-GCTCATGGAGGGATTCTTGG-3'**

T_m=63,4 °C; h-pin ΔG=-0,69; self ΔG=-5,38 ;FR ΔG=-6,24; FP ΔG=-6,5

Bt11_PPaP **5'-FAM-TTGGTGGAGACCATTCTTGGTCT-TAMRA-3'**

T_m=67,3 °C; h-pin ΔG=-5,49; self ΔG=-9,54 ;PF ΔG=-6,5; PR ΔG=-10,39

Bt11_PPaR **5'-GCCTCTGGTCGATGATAAATGG-3'**

T_m=63,8 °C; h-pin ΔG>0; self ΔG=-6,76 ;FR ΔG=-6,24; PR ΔG=-10,39

Bt11_PPaR_rev **5'-CCATTTATCATCGACCAGAGGC-**
3'

Dziękuję za uwagę