**Тема: Конструирование праймеров.**

**Цель:** Конструирование олигонуклеотидных затравок для полимеразной цепной реакции.

**Краткое содержание темы.**

При создании ПЦР-тест-системы одной из основных задач является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

Праймеры должны быть специфичны. Особое внимание уделяют 3’-концам праймеров, т.к именно с них начинает достраивать комплементарную цепь ДНК Taq-полимераза. Если их специфичность недостаточна, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно, синтез неспецифической ДНК (коротких или длинных фрагментов). Она видна на электрофорезе в виде тяжелых или легких дополнительных полос. Это мешает оценке результатов реакции, т.к легко перепутать специфический продукт амплификации с синтезированной посторонней ДНК. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.

Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом.

* Размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. Меньше 16-ти: слабая связь с целью
* Разница в температуре плавления праймеров - не более 2 градусов
* Ц+Г должно быть 40-60 %
* Для улучшения качества отжига рекомендуется подбирать праймеры так, чтобы последние несколько нуклеотидов 3' - конца праймера содержали GC-основания
* Отсутствие комплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров)
* Оптимальная концентрация праймеров подбирается эмпирически, но не должна быть больше 50 пикомолей на пробирку - иначе начнётся неспецифический отжиг праймеров
* Упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера:

Tm = [(A+T) x 2 °C] + [(G+C) x 4 °C](если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований)

Tm = 22 + 1.46([2 x (G+C)] + (A+T))(если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований)

**Тема: Конструированиевнутреннего контроля для ПЦР.**

**Цель:** Выбор ДНК-мишени для детекции фрагмента искусственной плазмиды. Конструирование олигонуклеотидных праймеров для детекции выбранного фрагмента.

В качестве матрицы для внутреннего контроля ПЦР удобно использовать плазмиды, поскольку их довольно просто воспроизводить в лабораторных условиях.

Схема экпсеримента: Выбор плазмиды, анализ нуклеотидной последовательности, конструирование праймеров, проверка олигонуклеотидов в BLAST.

Выбор плазмиды проводится с использованием локальной базы данных.

Анализ нуклеотидной последовательности проводится с использованием Unipro UGENE.

Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом.

* Размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. Меньше 16-ти: слабая связь с целью
* Разница в температуре плавления праймеров - не более 2 градусов
* Ц+Г должно быть 40-60 %
* Для улучшения качества отжига рекомендуется подбирать праймеры так, чтобы последние несколько нуклеотидов 3' - конца праймера содержали GC-основания
* Отсутствие комплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров)
* Оптимальная концентрация праймеров подбирается эмпирически, но не должна быть больше 50 пикомолей на пробирку - иначе начнётся неспецифический отжиг праймеров