pondělí 22.4.- poslední opakovací lekce

Možné termíny zkoušky:

(ještě v semestru, pak „kdykoliv“)

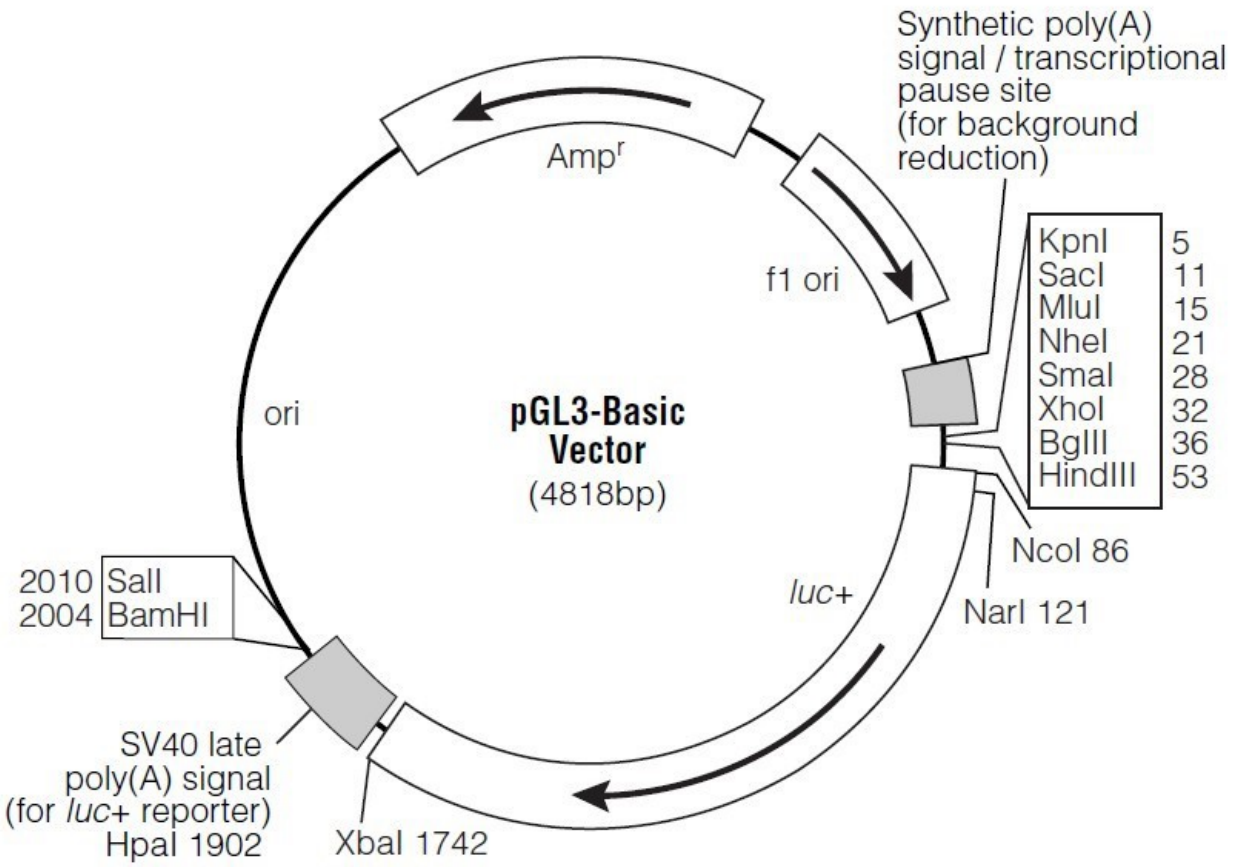
1) STŘEDA 24.4. 17:40 – 2DNY PO OPAKOVÁNÍ
2) PONDĚLÍ 29.4. 17:40
3) PONDĚLÍ 13.5. 17:40
4) PONDĚLÍ 20.5. 17:40 – PŮVODNÍ PLÁN -POSLEDNÍ TÝDEN SEMESTRU

Základy praktické Bioinformatiky

PETRA MATOUŠKOVÁ

2023/2024

ad DU8



- primery musí obsahovat RE z MCS, ne náhodné RE, které neštěpí fragment.

- nutné hlídat „směr“ klonování:

F primer – KpnI, SacI, …

R primer- HindII, XhoI..

Základy praktické bioinformatiky

Téma 9/10

Nukleotidová bioinformatika V

Cíle:

Student bude schopen navrhnout primery pro **kvantitativní stanovení vybraného genu (qPCR)** a navrhnout primery pro Pfu-mutagenezi .

„Bioinformatika nukleových kyselin IV“

Vyhledávání NK sekvencí

Analýza vlastností sekvencí-složení, reverse complement, identifikace restrikčních míst

Práce s kódující DNA=práce s proteiny / překlad DNA sekvence-otvírání čtecího rámce

Klonování, návrh primerů pro PCR, mutační primery, **rt-PCR, kontrola primerů**

Předpověď sekundárních struktur

Porovnávání sekvencí, identifikace neznámé sekvence

Vyhledání SNPs

„čtení“ sekvenačních dat a spojování fragmentů

Vyhledávání hladin expresí jednotlivých genů

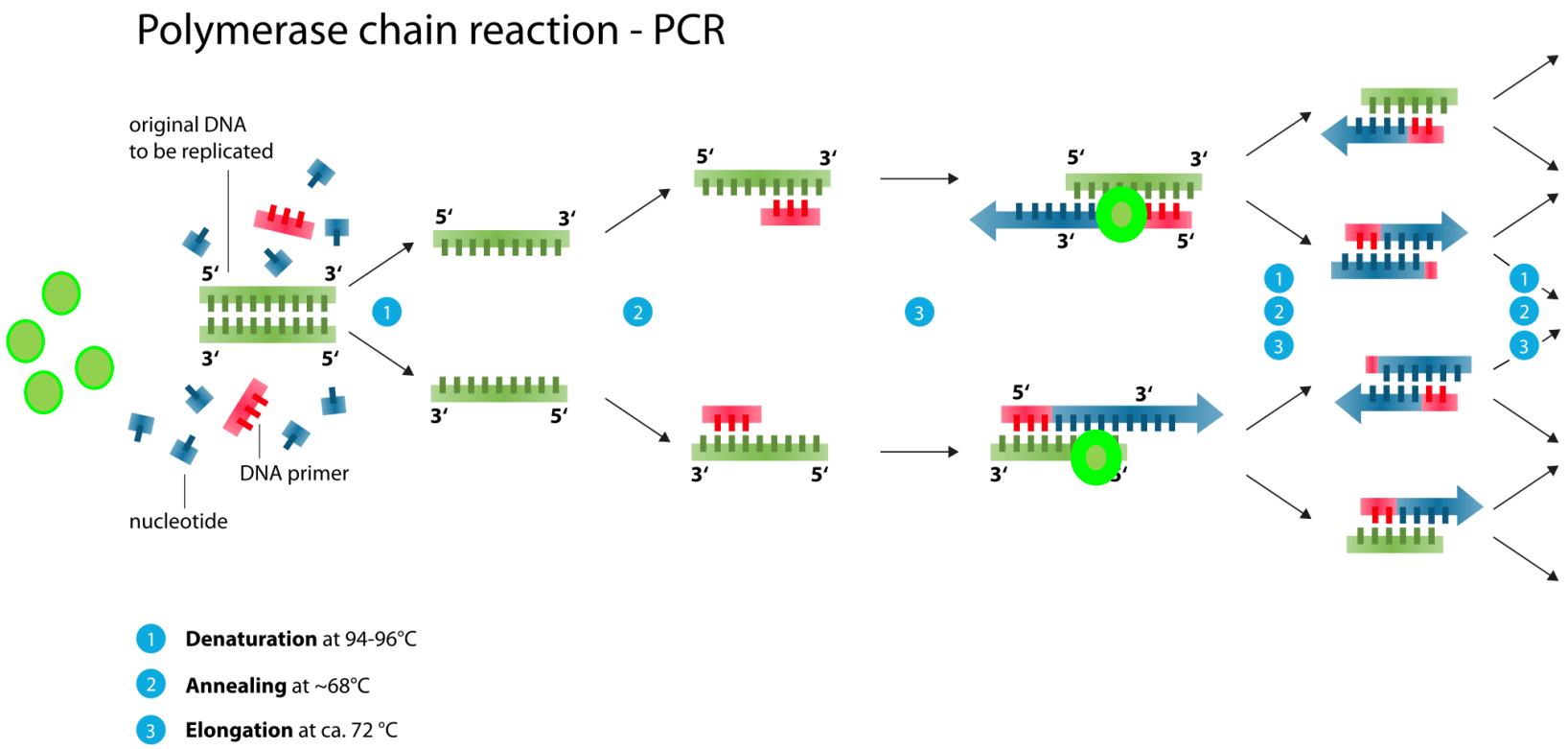
mikroRNA

Celé genomy

….

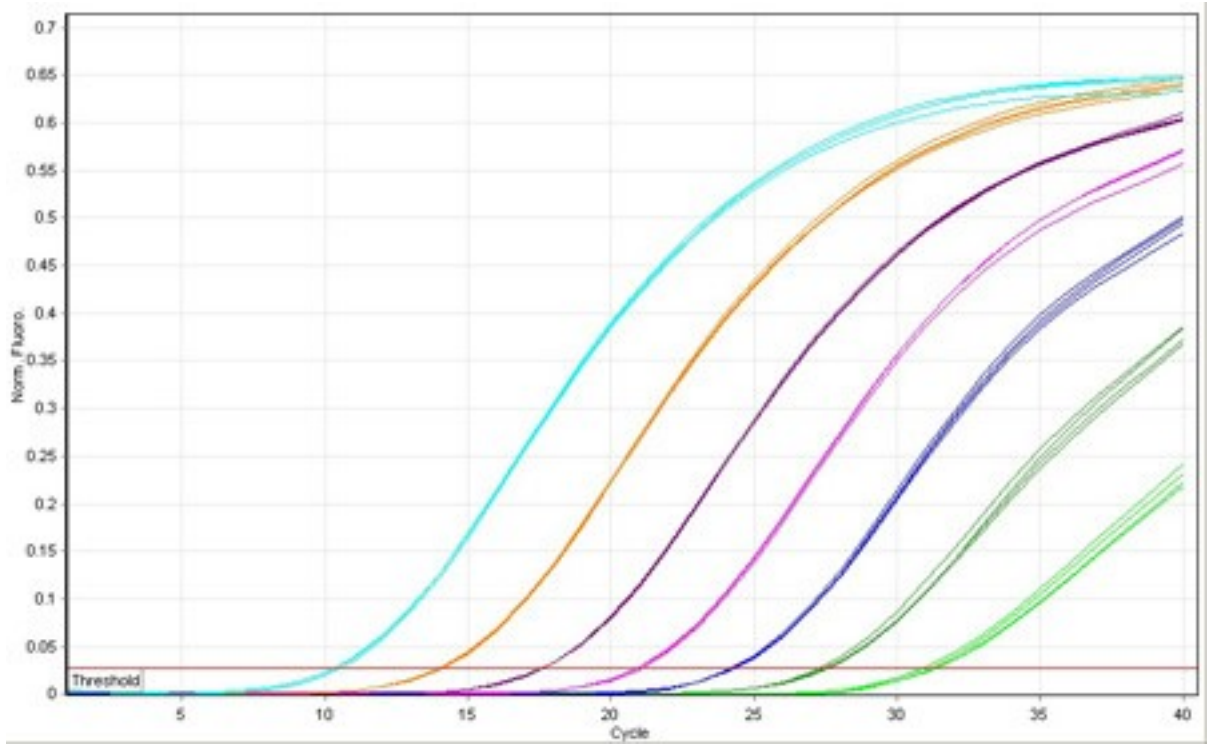
Kvantitativní (q)PCR (real time-PCR)

SYBR Green I



(wiki)

Kvantitativní (q)PCR (real time - PCR)



Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

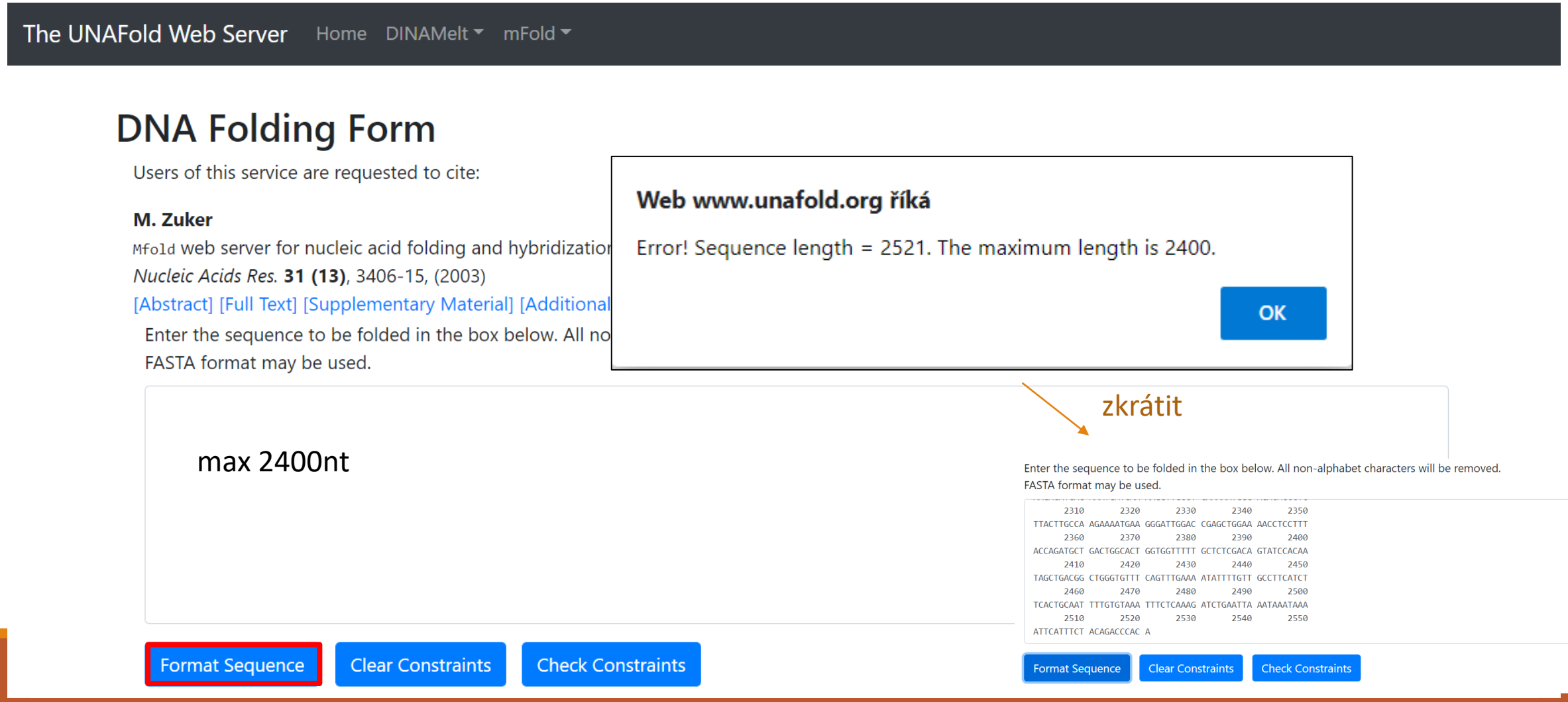
Primery:

- nezáleží kde v rámci sekvence leží !

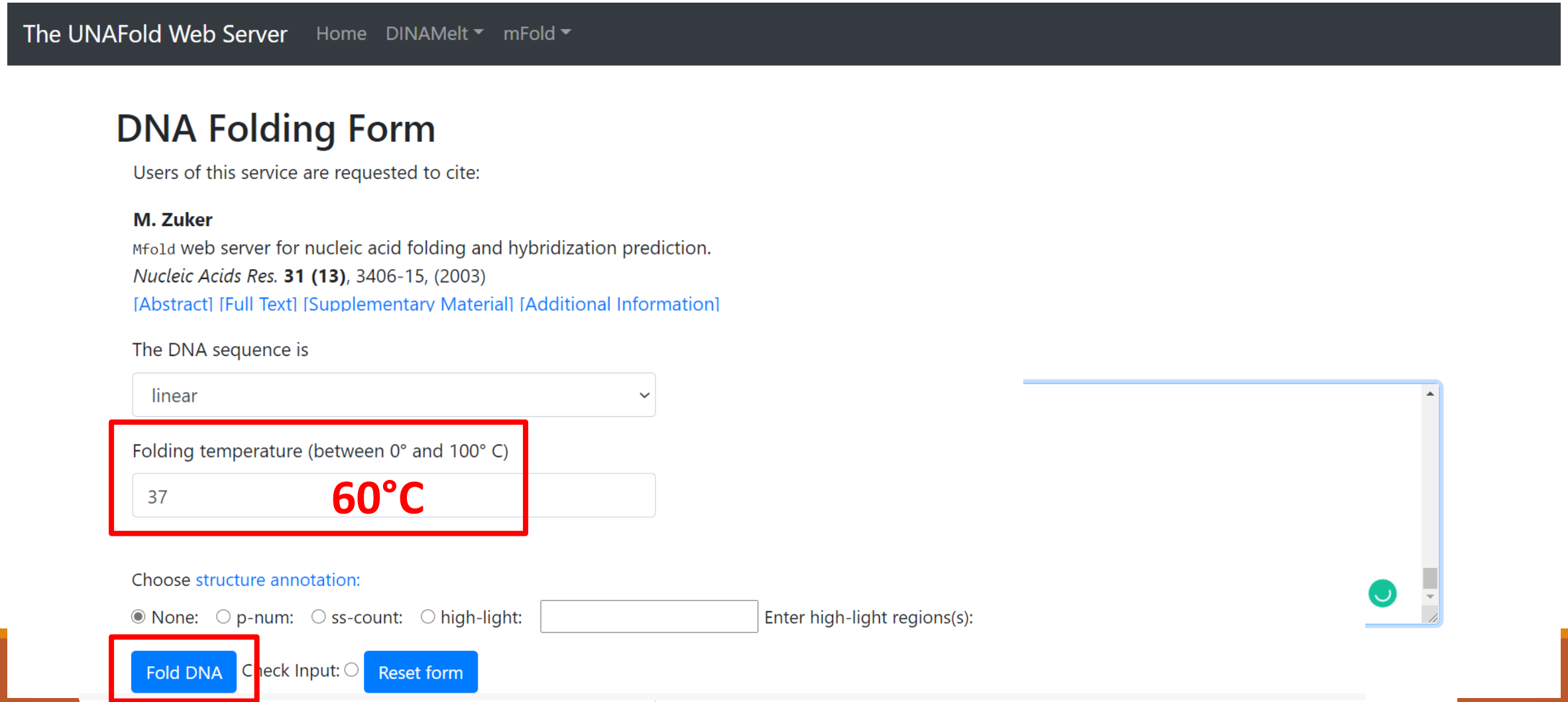
- krátký produkt „amplikon“ = délka sekvence mezi primery (včetně): **50-150nt**
- musí fungovat „**perfektně**“ → vyhnout se místům s vlásenkou (sekundární struktura)

➢**mFOLD**-predikce sekundárních struktur DNA

Návrh primerů-predikce sekundárních struktur

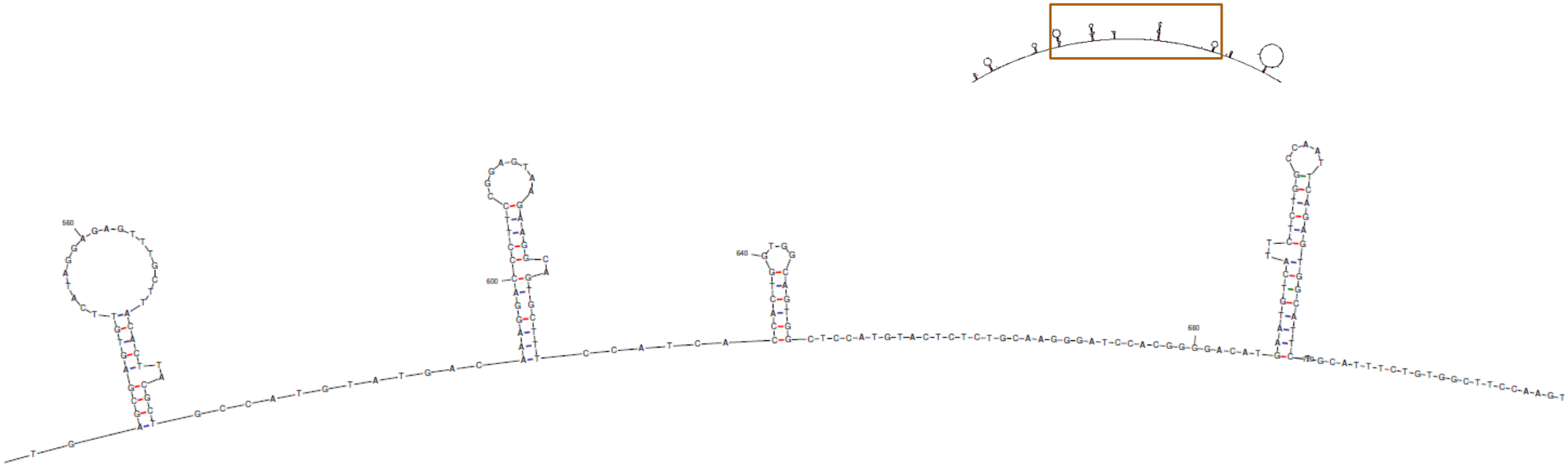


Návrh primerů-predikce sekundárních struktur



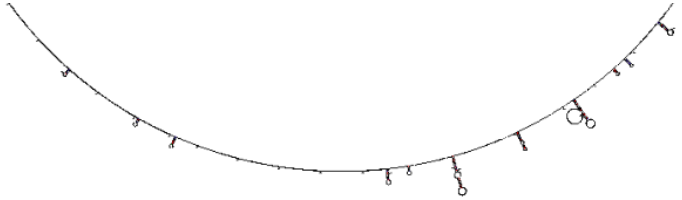
Návrh primerů-predikce sekundárních struktur

mFOLD: nastavit 60°C



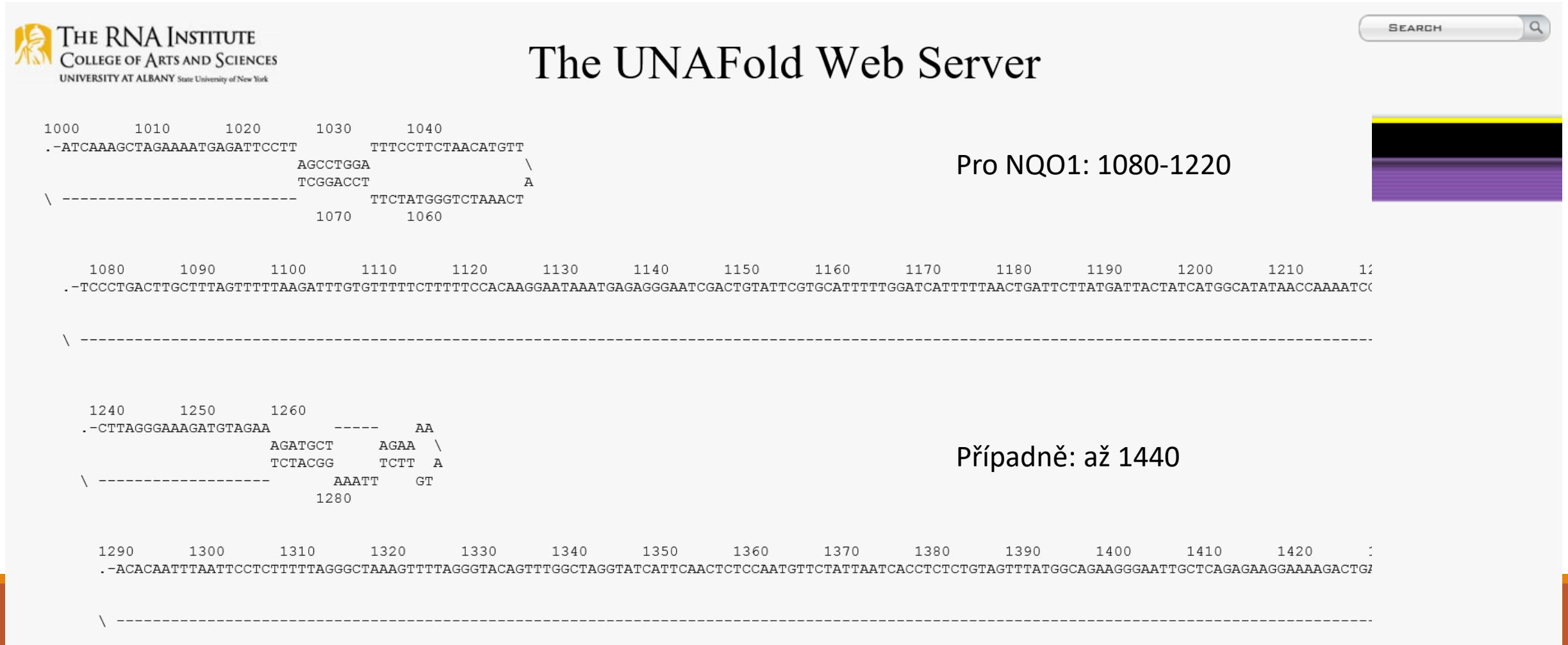
Structure 1 : ΔG = -45.17 kcal/mol (Thermodynamic Details).
Different file formats: PostScript, pdf, png, jpg, .ct file, Vienna, RNAML, RnaViz ct, Mac ct, RN

These computations were performed on cc1-03.rit.albany.edu in 1 min. and 1.11 sec. and can
17Apr17-14-09-14
The results will be erased in 72 hours. To ask a question or to make a comment, please regist
reading previously submitted questions and comments.



Návrh primerů-predikce sekundárních struktur

„Folding temperature“: nastavit 60°C



Pro NQO1: 1080-1220

Případně: až 1440

Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Primery:

- nezáleží kde v rámci sekvence leží !

- krátký produkt „amplikon“ = délka sekvence mezi primery (včetně): **50-150nt**
- musí fungovat „**perfektně**“ → vyhnout se místům s vlásenkou (sekundární struktura)

➢**mFOLD**-predikce sekundárních struktur DNA → výběr „vhodné“ oblasti

THE RNA INSTITUTE
COLLEGE OF ARTS AND SCIENCES
UNIVERSITY AT ALBANY State University of New York

The mfold

Home | DINAMelt Application | Mfold Application | For

Applicati
- RNA Folding
- DNA Folding
- Structure Disp Determination
- RNA Folding energies)

View Fol
- Folding Resul

Docume
- Mfold Referen
- FAQs
- Folding & outp
- Folding with c

Software
- Mfold

About
- About

to cite:

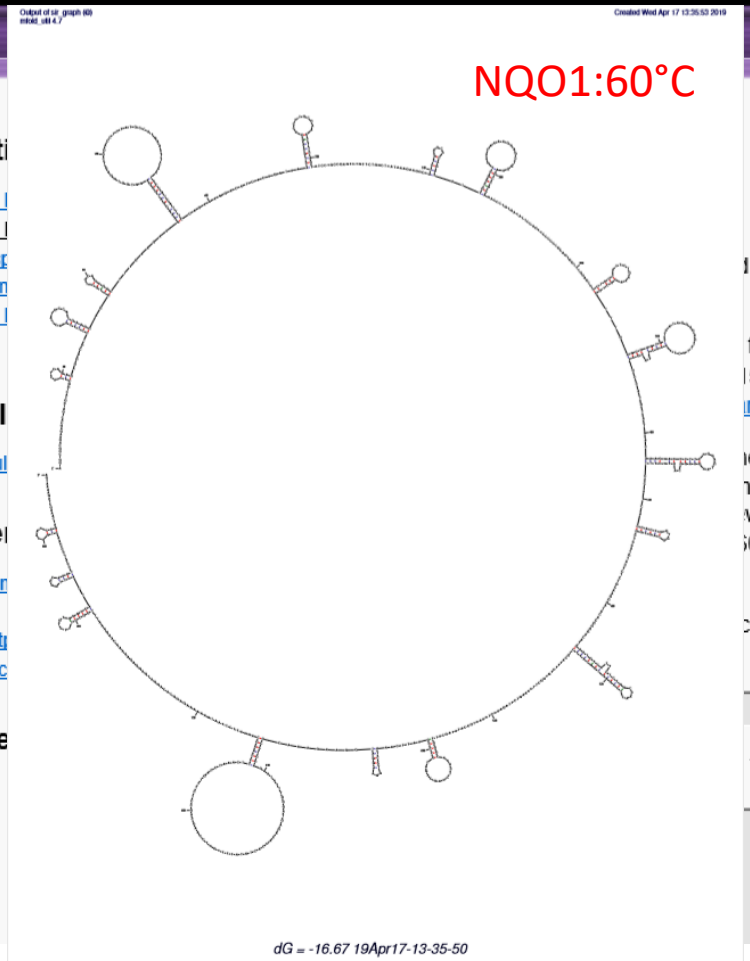
folding and hybridi
5, (2003)
ry Material] [Additi

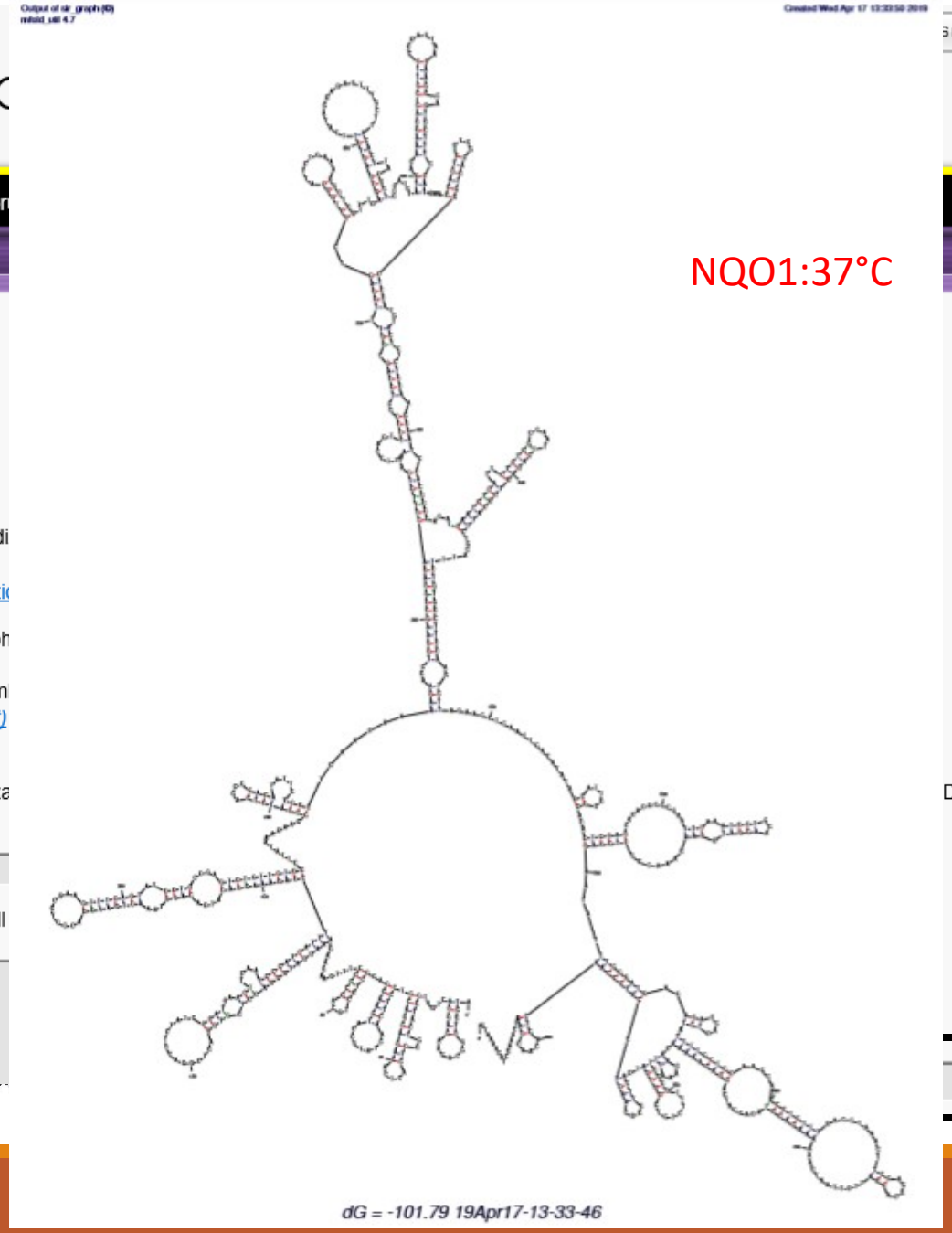
e laboratory of Joh
ergy rules is:
w of polymer, dum
0-1465. *(Abstract)*

cleic Acid Hybridiza

the box below. All

Detroit,





Vyzkoušejte si....

-Vložit vaši sekvenci (CDS nebo jen část max 2400nt) do **mFold** a podívat se po „vhodných“ oblastech pro návrh qPCR primerů

Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Primery:

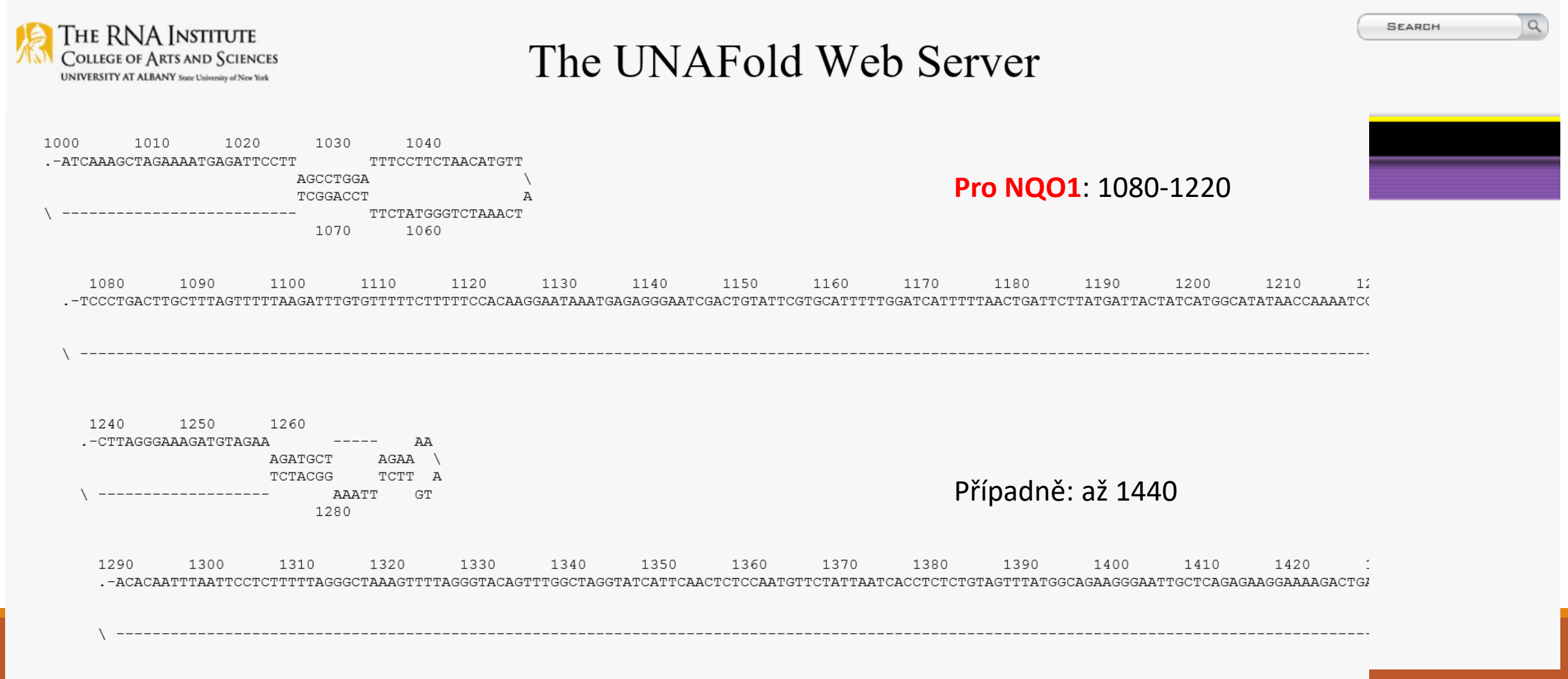
- nezáleží kde v rámci sekvence leží !

- krátký produkt „amplikon“ = délka sekvence mezi primery (včetně): **50-150nt**
- musí fungovat „**perfektně**“ → vyhnout se místům s vlásenkou (sekundární struktura)

➢ **mFOLD**-predikce sekundárních struktur DNA → výběr „vhodné“ oblasti

Primer3
+omezit na vybranou oblast

Návrh primerů-predikce sekundárních struktur



Pro NQO1: 1080-1220

Případně: až 1440

Návrh primerů-**Primer3**-na vybranou oblast

Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence.

disclaimer | code | cautions

Select the Task for primer selection: generic

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): NONE

```
>NM_000903.2 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA
CCGCCCTTGTAGGCTGTCCACCTCAAACGGGCCGGACAGGATATATAAGAGAGAATGCACCGTGCACTAC
ACACGCGACTCCCACAAGGTTGCAGCCGGAGCCGCCCAGCTCACCGAGAGCCTAGTTCCGGCCAGGGTCG
CCCCGGCAACCACGAGCCCAGCCAATCAGCGCCCCGGACTGCACCAGAGCCATGGTCGGCAGAAGAGCAC
TGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTT
GAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGA
```

☑ 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)

Pick Primers | Download Settings | Reset Form

Sequence Id		A string to identify your output.
Targets		E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.
Overlap Junction List		E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the source sequence with -: e.g. ...ATCTAC-TGTCAT.. means that primers must overlap the junction between the C and T.
Excluded Regions		E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.
Pair OK Region List		See manual for help.
Included Region	1080,140	E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base region starting at position 20. Or use { and } in the source sequence to mark the beginning and end of the included region: e.g. in ATC {TTC...TCT}AT the included region is TTC...TCT.
Start Codon Position		
Internal Oligo Excluded Region		

=1080-1220

Návrh primerů-Primer3-na vybranou oblast

Pair OK Region List

Included Region 1080,140

Start Codon Position

Internal Oligo Excluded Region

Force Left Primer Start -10000(Force Right Primer Start -10000(

Force Left Primer End -10000(Force Right Primer End -10000(

Sequence Quality

Min Sequence Quality 0 Min End Sequence Quality 0 Sequen

Pick Primers | Download Settings | Reset Form

General Primer Picking Conditions

Upload the settings from a file Procházet...

Primer Size	Min	18	Opt	20	Max	23		
Primer Tm	Min	57.0	Opt	59.0	Max	62.0	Max Tm Difference	5
Product Tm	Min	-10000(	Opt	0.0	Max	100000		
Primer GC%	Min	30.0	Opt	50.0	Max	70.0		

Product Size Ranges 50-150

Number To Return 5 Max 3' Stability 9.0

Max Library Mispriming 12.00 Pair Max Library Mispriming 20.00

Primer3 Output

PRIMER PICKING RESULTS FOR NM_000903.2 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), tra

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
NO PRIMERS FOUND - Help

Jiná nebo Větší oblast: 1080,360

Primer3 Output

PRIMER PICKING RESULTS FOR NM_000903.2 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcr

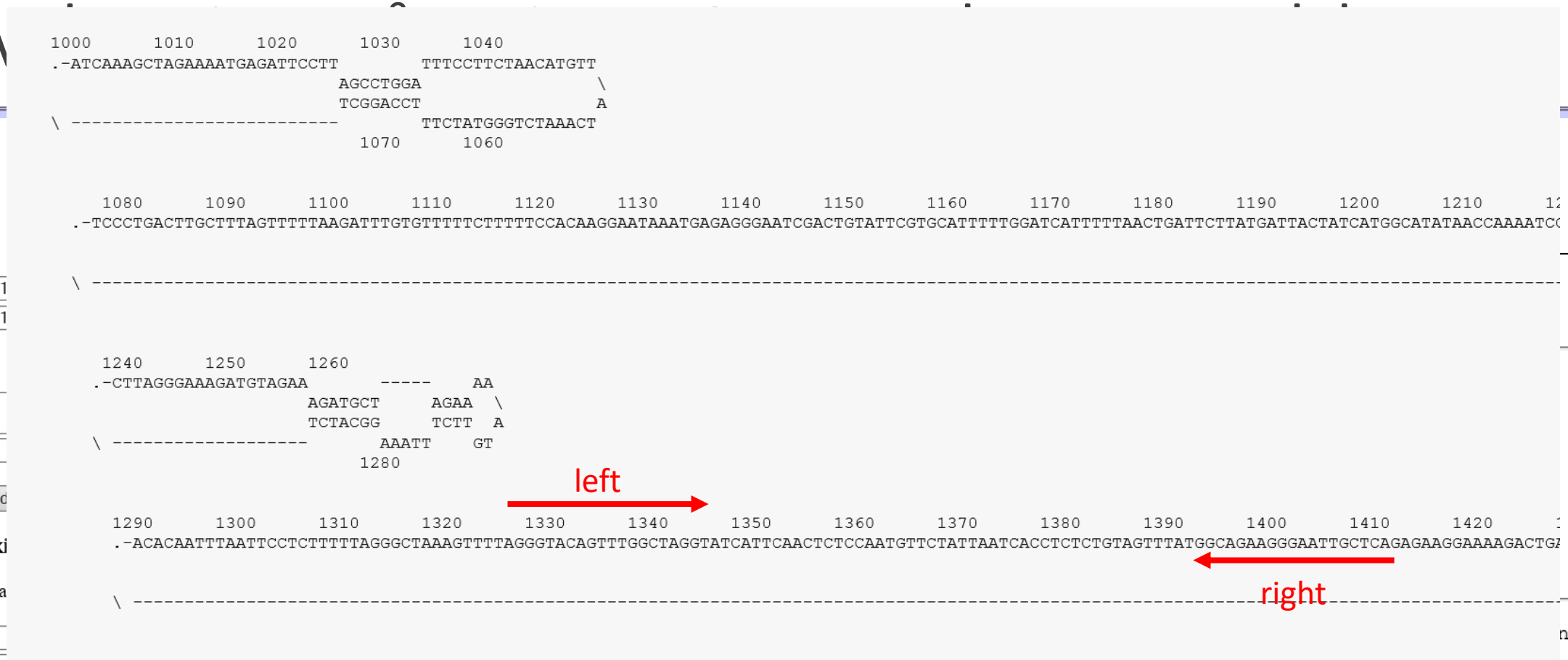
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any th	3' th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	1325	20	57.96	50.00	0.00	0.00	0.00	AGGGTACAGTTTGGCTAGGT
RIGHT PRIMER	1411	20	58.90	55.00	0.00	0.00	0.00	CTGAGCAATTCCCTTCTGCC

SEQUENCE SIZE: 2601
INCLUDED REGION SIZE: 340

PRODUCT SIZE: 87, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

Náv



Pair OK Region List

Included Region

Start Codon Position

Internal Oligo Excluded Region

Force Left Primer Start -1

Force Left Primer End -1

Sequence Quality

Min Sequence Quality 0

Pick Primers Download

General Primer Picki

Upload the settings from a

Primer Size Min 18

Primer Tm Min 57.0 Opt 59.0 Max 62.0 Max Tm Difference

Product Tm Min -100000 Opt 0.0 Max 100000

Primer GC% Min 30.0 Opt 50.0 Max 70.0

Product Size Ranges 50-150

Number To Return 5 Max 3' Stability 9.0

Max Library Mispriming 12.00 Pair Max Library Mispriming 20.00

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
```

OLIGO	start	len	tm	gc%	any th	3' th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	1325	20	57.96	50.00	0.00	0.00	0.00	AGGGTACAGTTTGGCTAGGT
RIGHT PRIMER	1411	20	58.90	55.00	0.00	0.00	0.00	CTGAGCAATTCCCTTCTGCC

√

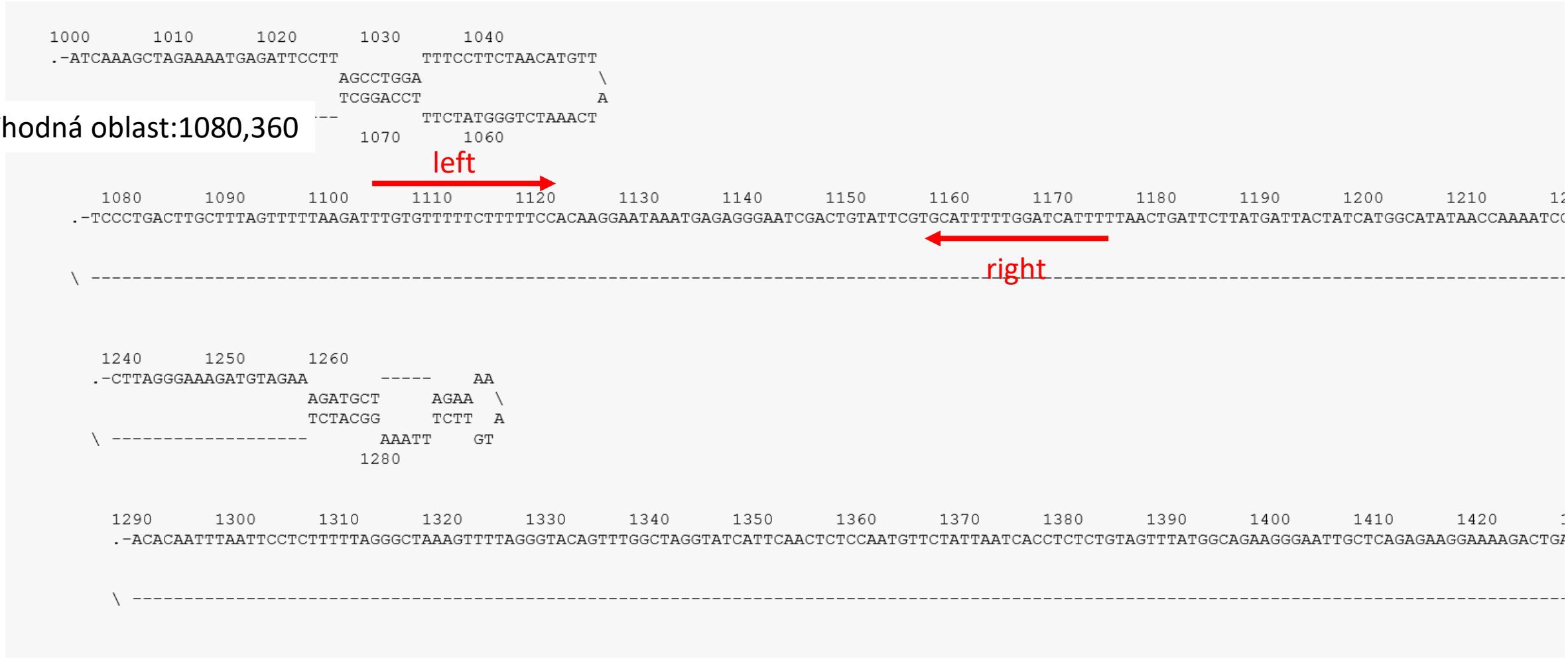
```
SEQUENCE SIZE: 2601
INCLUDED REGION SIZE: 340

PRODUCT SIZE: 87, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
```

Vyzkoušejte si....

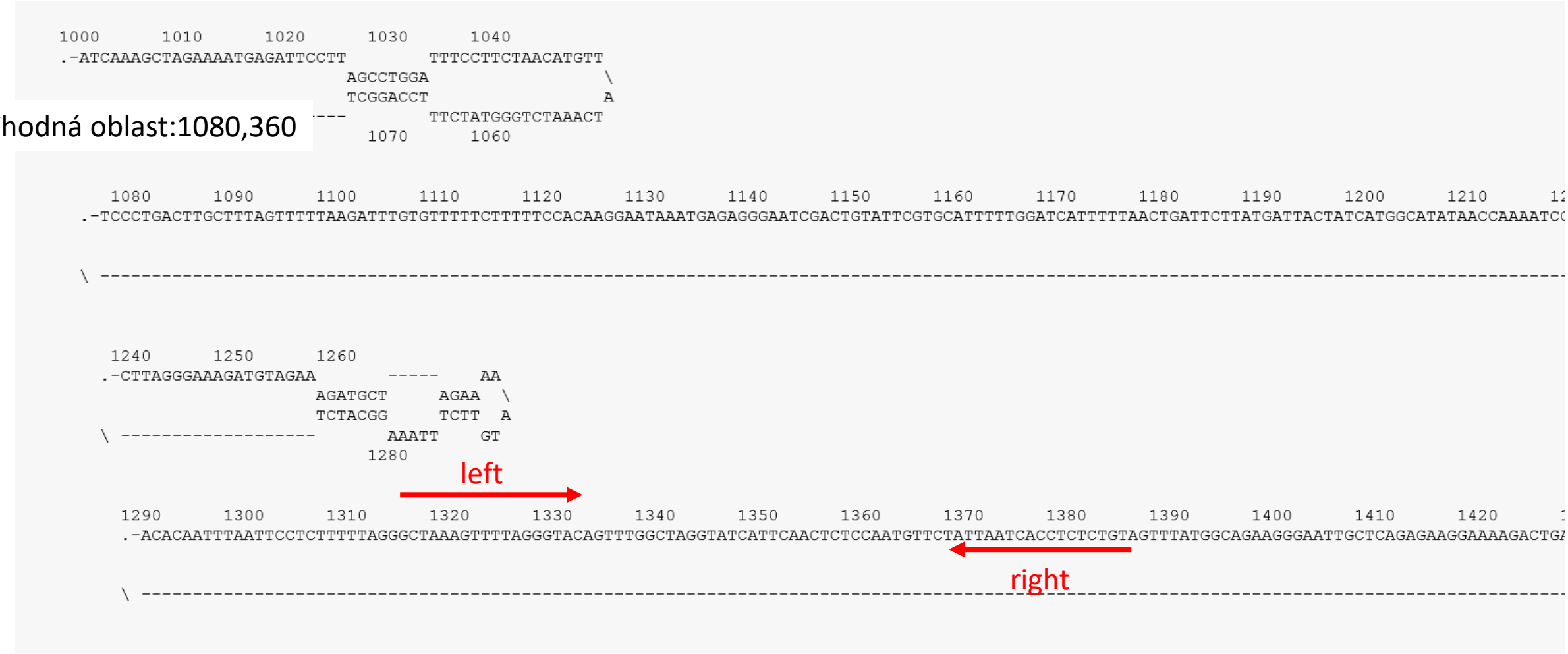
Vložit vaši sekvenci do mFold a podívat se po „vhodných“ oblastech pro návrh qPCR primerů

Najít primery v těchto „vhodných“ oblastech

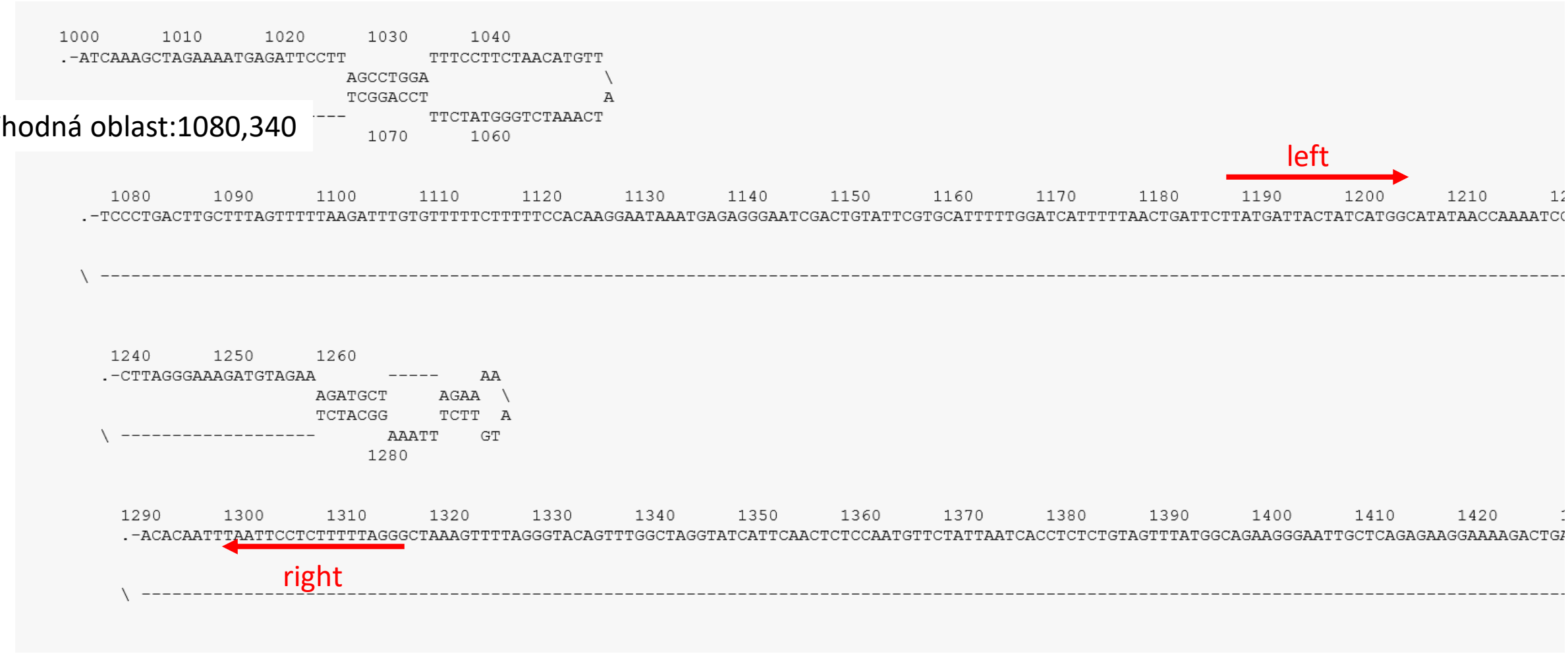
Vhodná oblast:1080,360



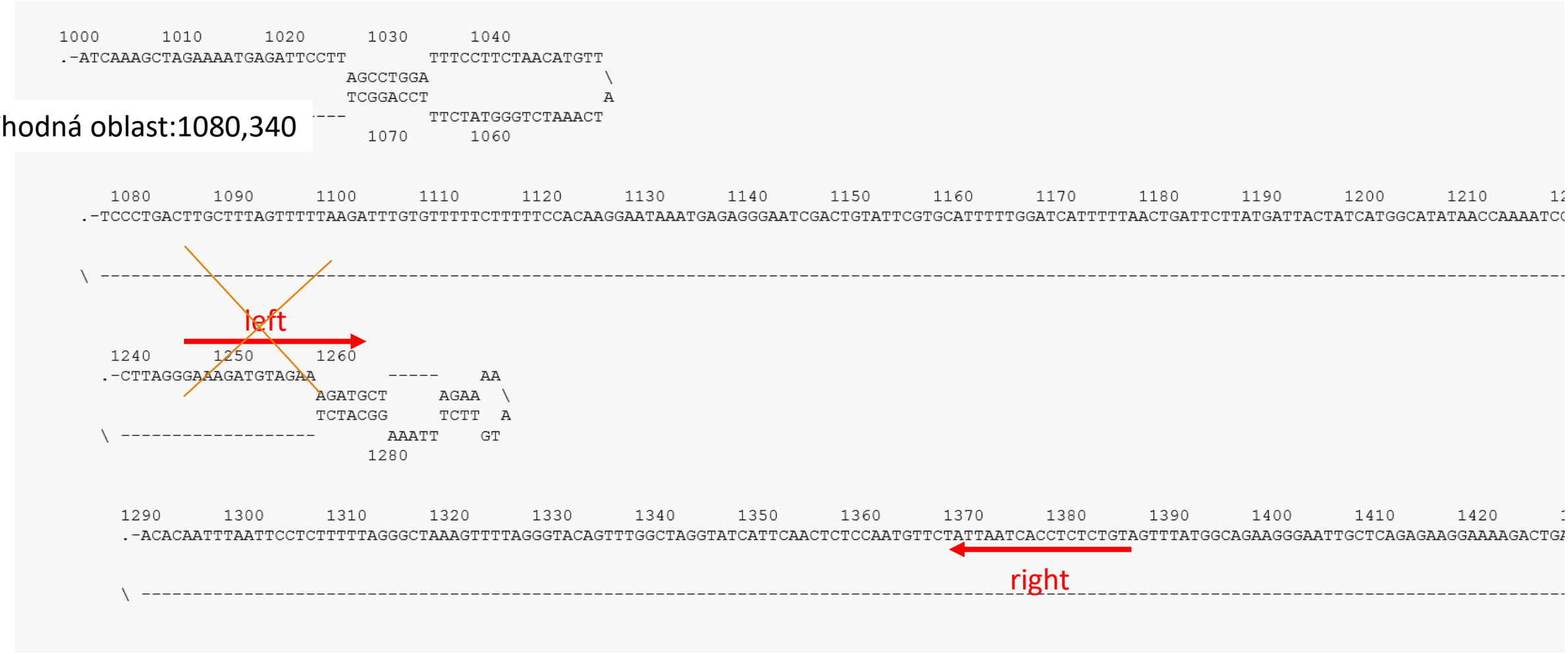
Vhodná oblast:1080,360



Vhodná oblast:1080,340

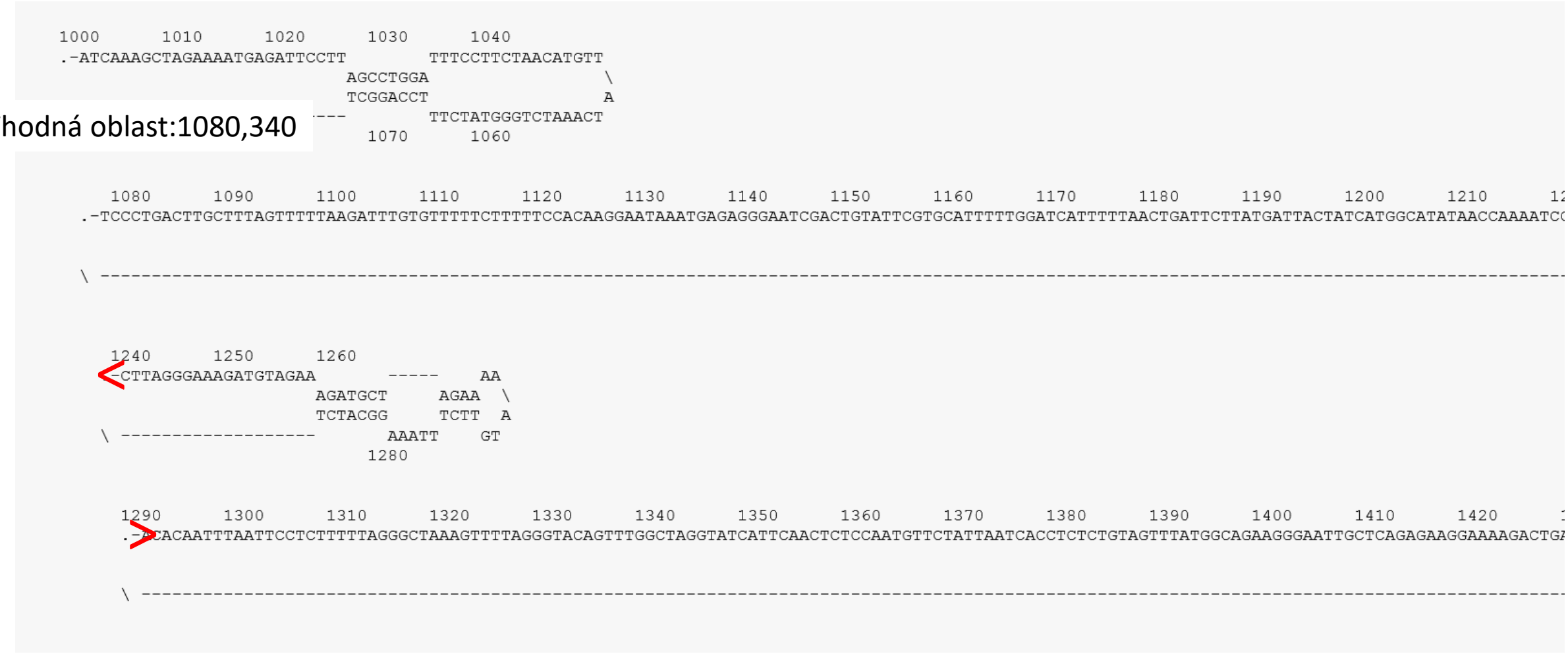


Vhodná oblast:1080,340



→Někdy nutné „maskování“ oblastí vlásenek: < >

(Alt gr „<„ Alt gr „>„)

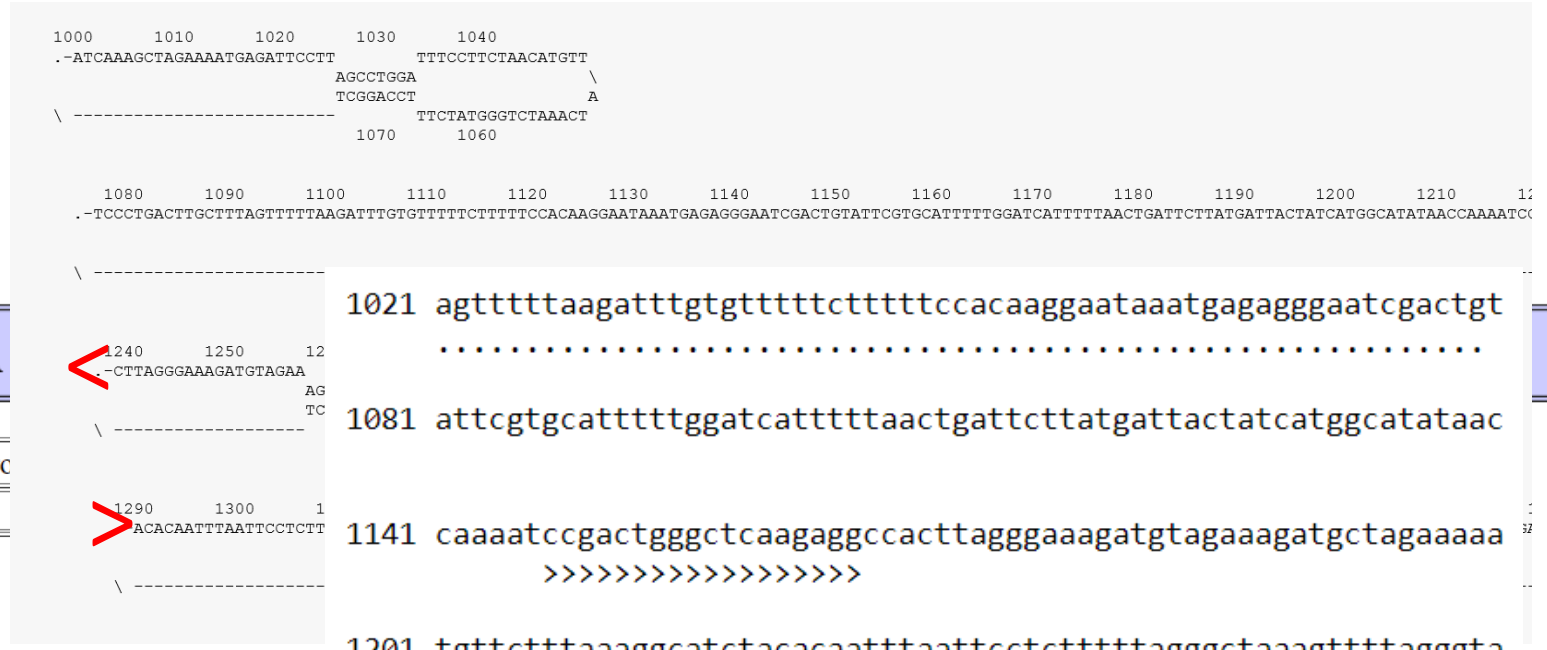


Vhodná oblast:1080,340

→Někdy nutné „maskování“ oblastí vlásenek: < > (Alt gr „<„ Alt gr „>„)

Nebo: Excluded region: 1240,50 (odkud kolik nt zakážeme)

Návrh primerů:



Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA

Pick left primer, or use left primer below | Pick hybridization prc

Pick Primers | Download Settings | Reset Form

Sequence Id		A string to identify your output.
Targets		E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bas that primers must flank the central CCCC.
Overlap Junction List		E.g. 27 requires one primer to overlap the junct that primers must overlap the junction between
Excluded Regions	1240,50	E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in t .. ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the
Pair OK Region List		See manual for help.
Included Region	1080,340	E.g. 20,400: only pick primers in the 400 base included region: e.g. in ATC{TTC...TCT}AT th
Start Codon Position		
Internal Oligo Excluded Region		

Force Left Primer Start -1000000 Force Right Primer Start -1000000

Force Left Primer End -1000000 Force Right Primer End -1000000

Sequence Quality

Vyzkoušejte si....

Vložit vaši sekvenci do mFold a podívat se po „vhodných“ oblastech pro návrh qPCR primerů

Najít primery v těchto „vhodných“ oblastech – když to nejde…< > maskovat úseky vlásenek

Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Primery: nezáleží kde v rámci sekvence leží !

krátký amplikon =délka sekvence mezi primery (včetně):**50-150nt**

ale: musí fungovat „perfektně“ → vyhnout se místům s vlásenkou

mFOLD-predikce sekundárních struktur DNA

→ výběr „vhodné“ oblasti

Primer3-omezit na vybranou oblast

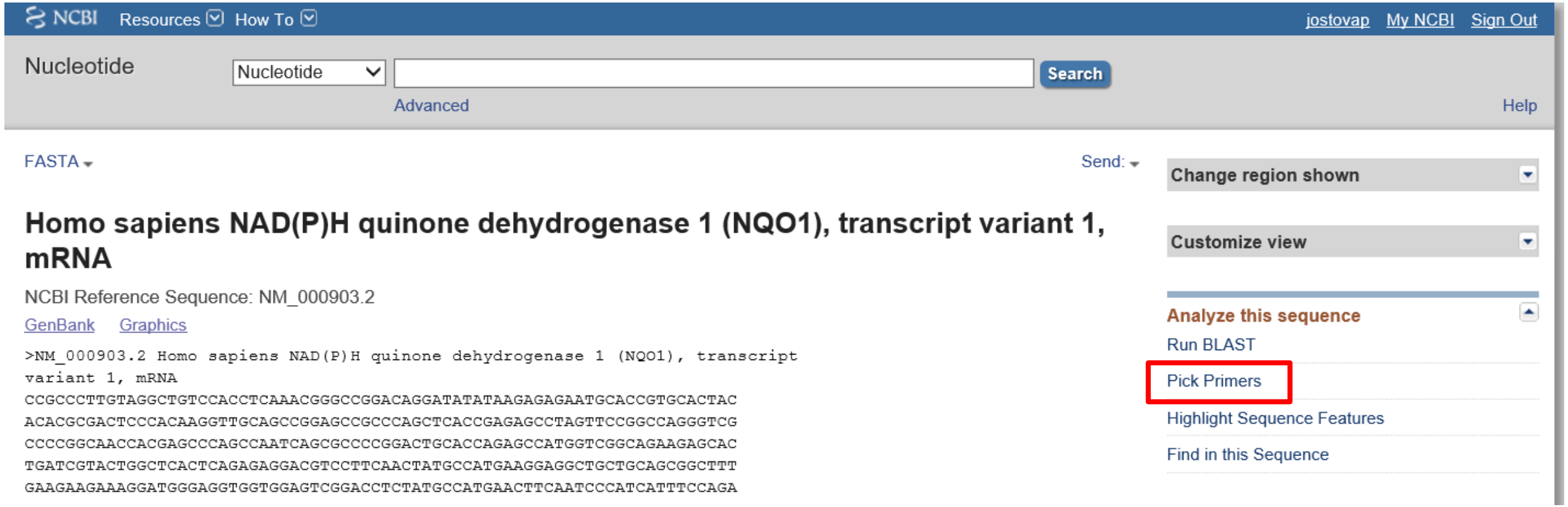
→Někdy nutné „maskování“ oblastí vlásenek:

Excluded region nebo < > (Alt gr „<„ Alt gr „>„)

→**Primer BLAST**-kontrola specificity

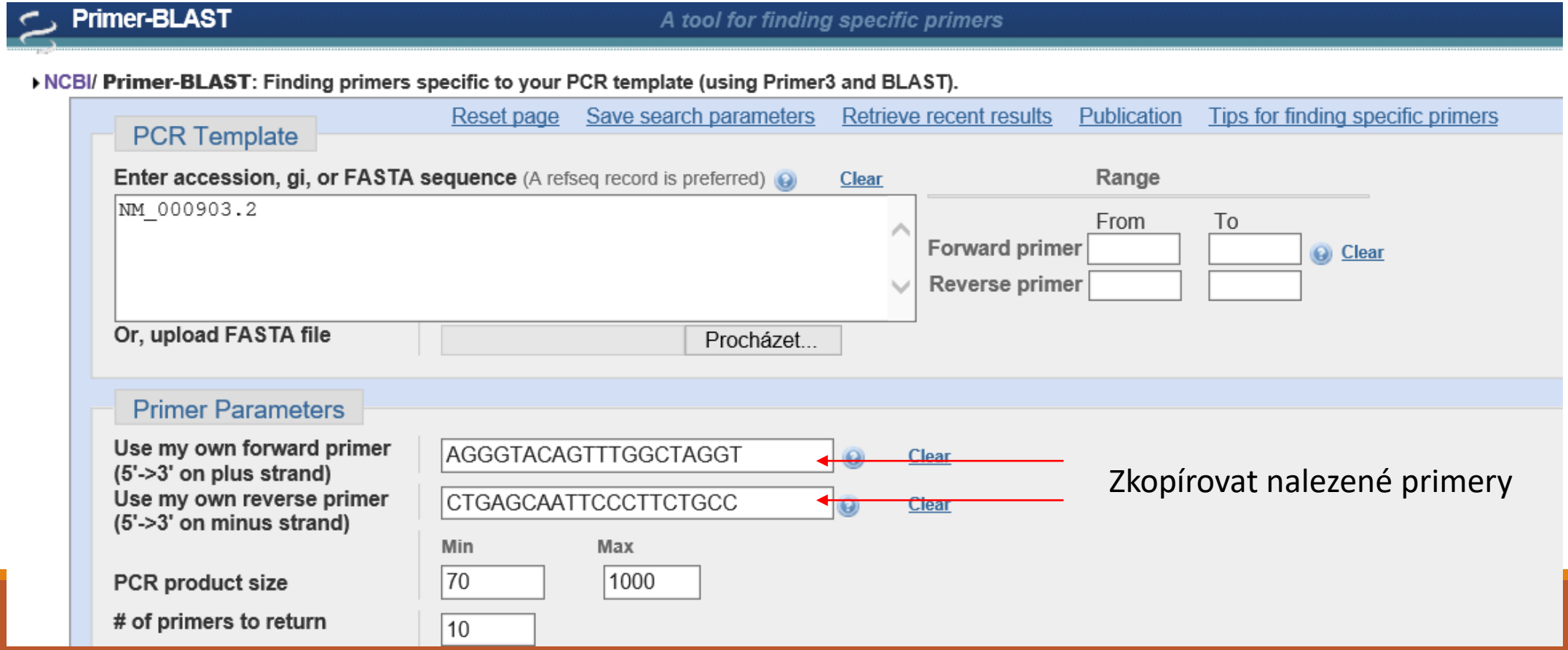
Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Kontrola specifity: NCBI/Pick Primers (Primer BLAST)



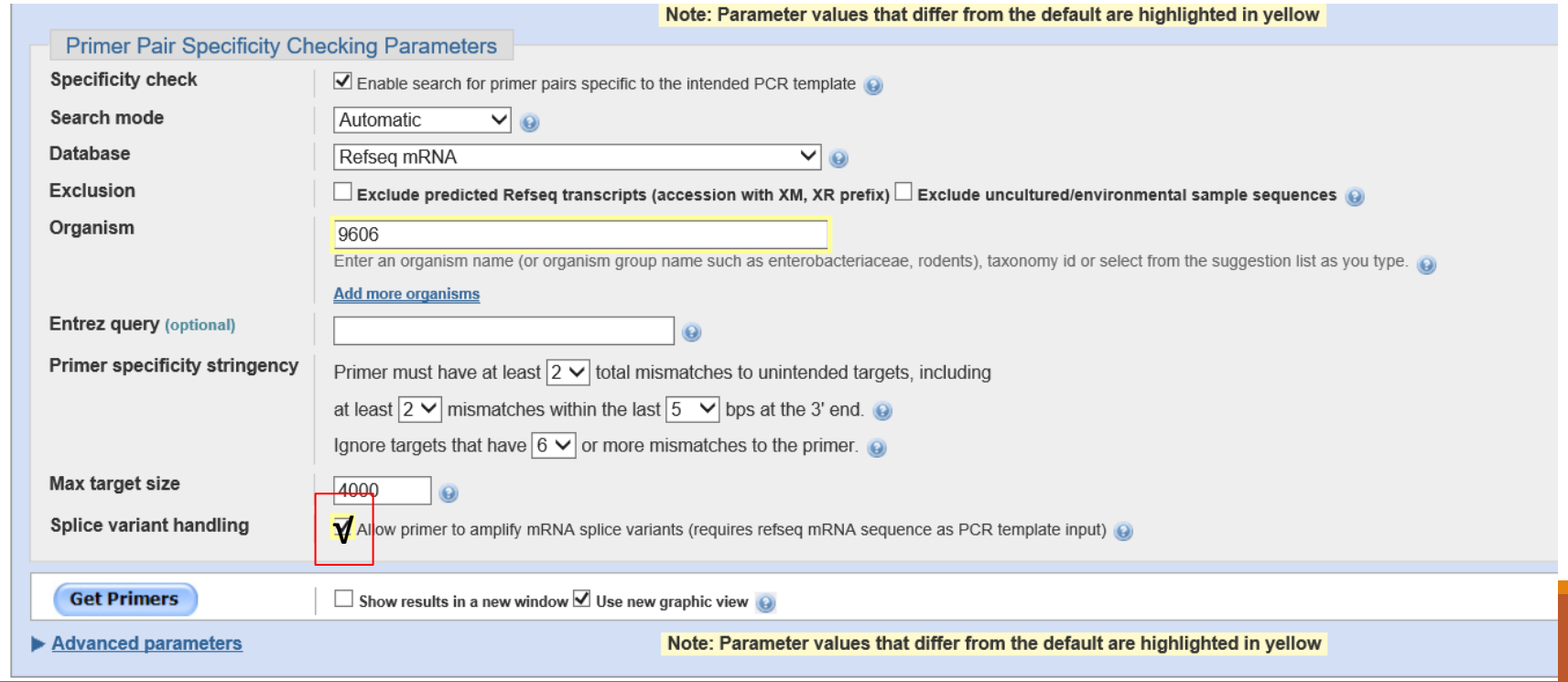
Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Kontrola specifity: NCBI/Pick Primers (Primer BLAST)



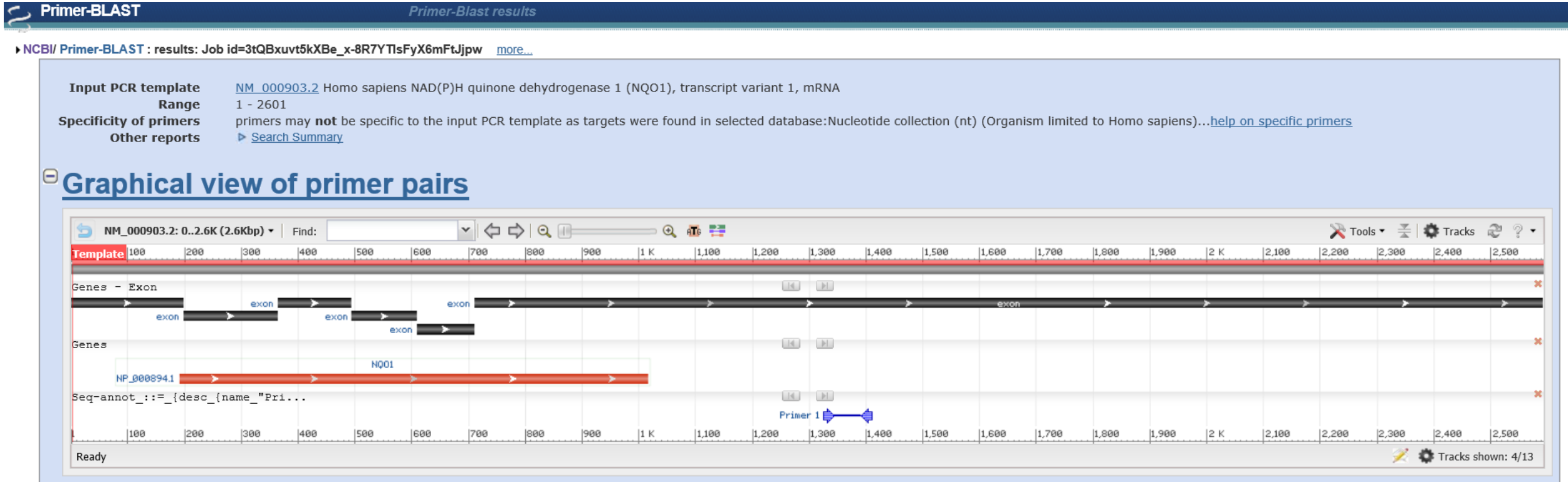
Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Kontrola specifity: NCBI/Pick Primers (Primer BLAST)



Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Kontrola specifity: NCBI/Pick Primers (Primer BLAST)



Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Kontrola specifity: NCBI/Pick Primers (Primer BLAST)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

NCBI/ Primer-BLAST : results: Job id=3tQBxuvt5kXBe_x-8R7YTlsFyX6mFtJjpw more...

Input PCR template NM_000903.2 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA
Range 1 - 2601
Specificity of primers primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database:Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Homo sapiens)...help on specific primers
Other reports Search Summary

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGGGTACAGTTTGGCTAGGT	Plus	20	1325	1344	57.96	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	CTGAGCAATTCCCTTCTGCC	Minus	20	1411	1392	58.90	55.00	4.00	1.00
Product length	87								

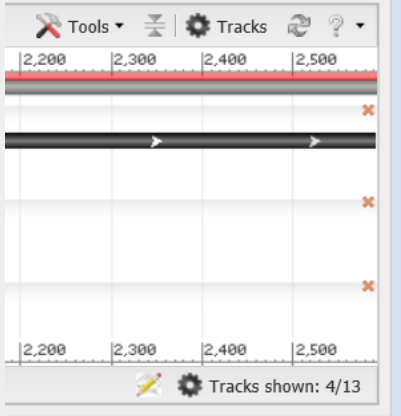
Products on intended target ok

>NM_000903.2 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 87
Forward primer  1     AGGGTACAGTTTGGCTAGGT  20
Template        1325  ....................  1344

Reverse primer  1     CTGAGCAATTCCCTTCTGCC  20
Template        1411  ....................  1392
```

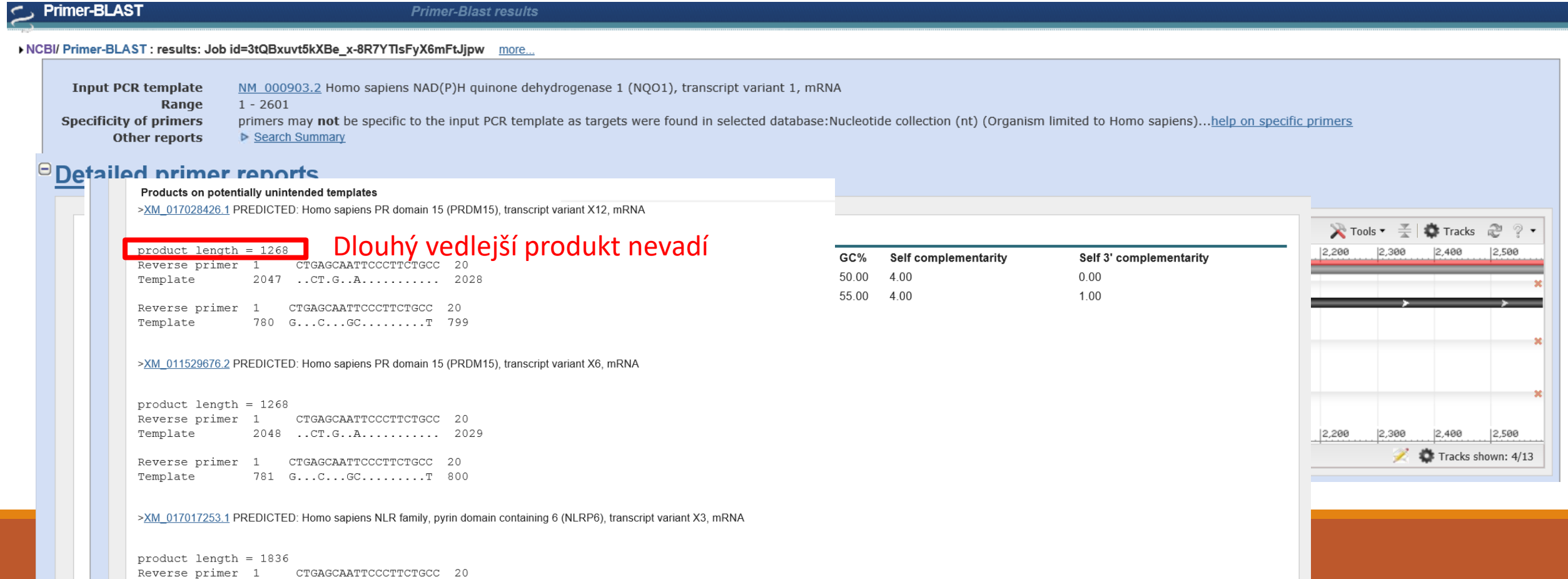
Products on allowed transcript variants ok

>NM_001286137.1 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 4, mRNA



Návrh primerů: kvantitativní (q)PCR (rt-PCR)

Kontrola specifity: NCBI/Pick Primers (Primer BLAST)



Vyzkoušejte si....

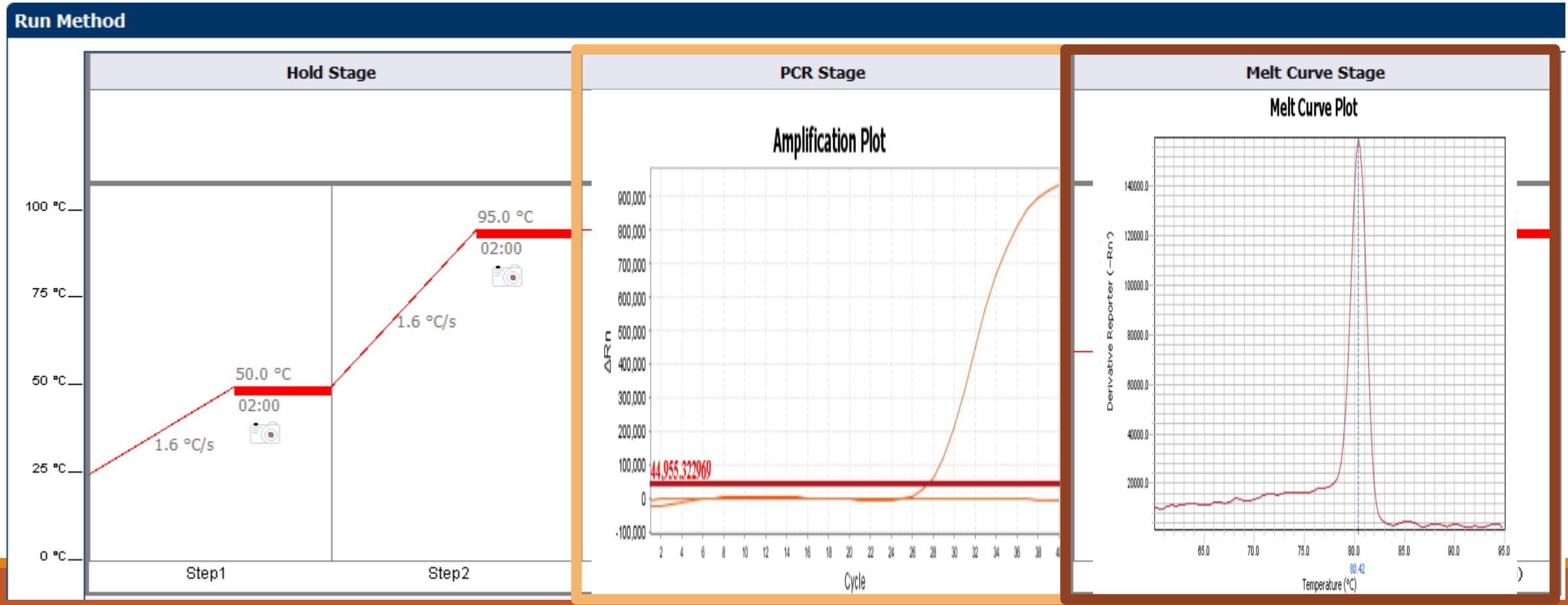
Vložit vaši sekvenci do mFold a podívat se po „vhodných“ oblastech pro návrh qPCR primerů

Najít primery v těchto „vhodných“ oblastech

Zkontrolujte specifitu nalezených primerů

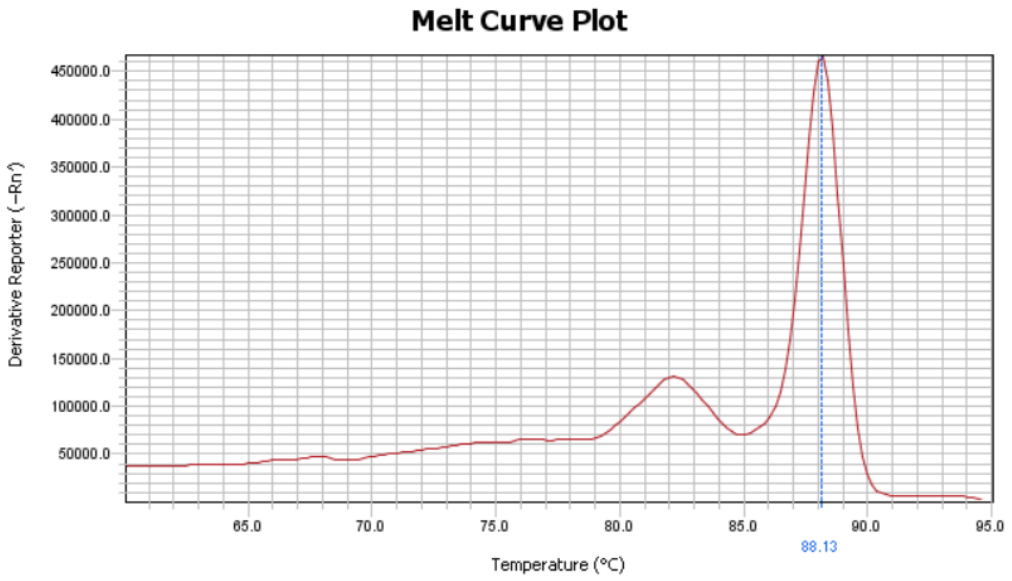
Ověření qPCR primerů – **v laborce**

Funkce: cDNA (+NTC)

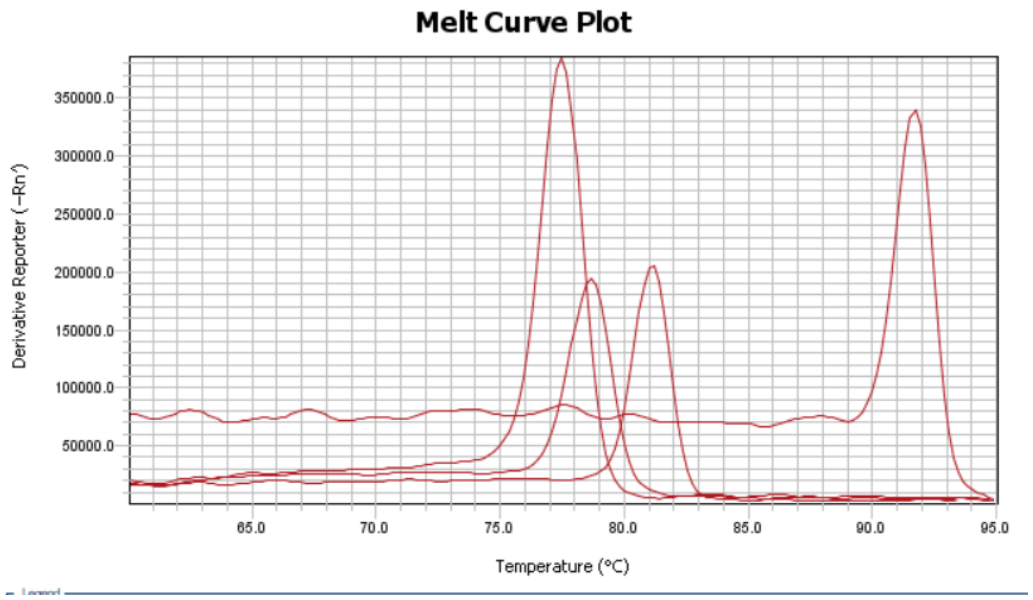


Ověření qPCR primerů – **v laborce**

x Více produktů v jedné reakci



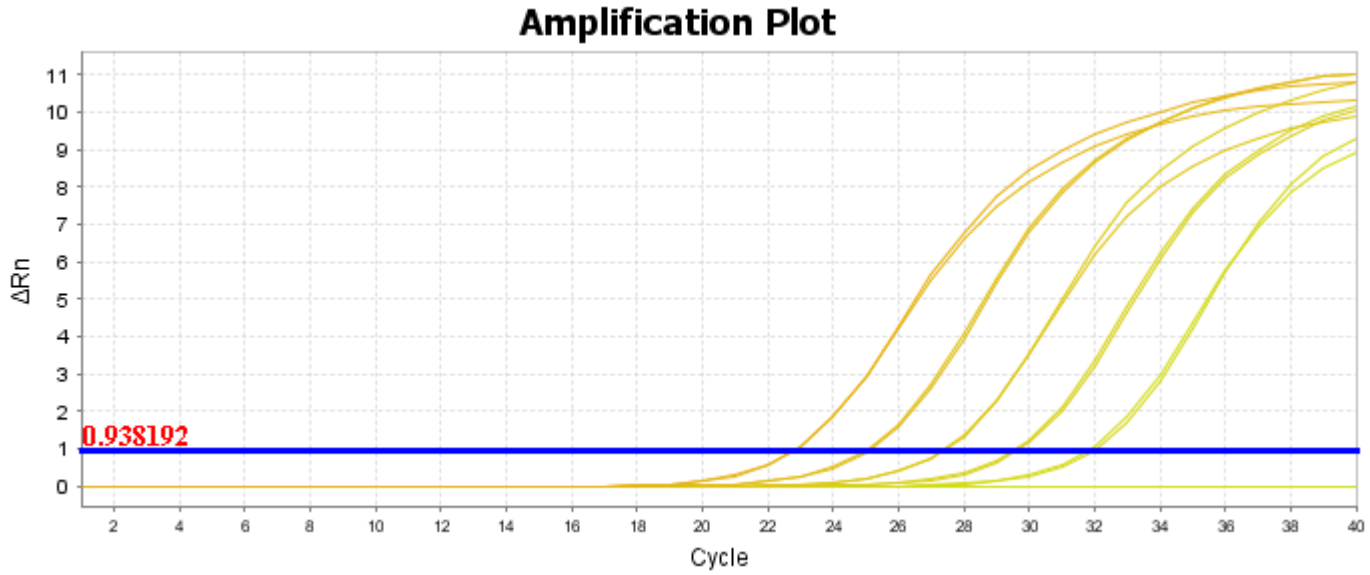
různé produkty stanovené různými primery

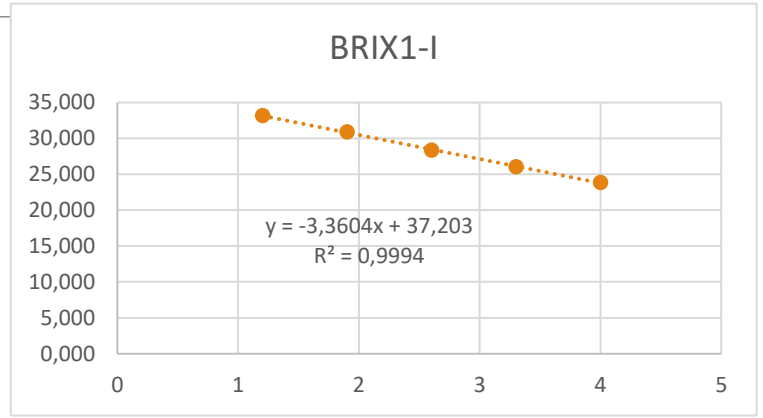


Ověření qPCR primerů – **v laborce**

✓Funkce: cDNA (+NTC)

Účinnost: ředící řada cDNA





$E=10^{-(1/slope)}-1$

$E=10^{-(1/-3,3604)}-1=0,98…$**98%**

(90-110%)

Základy praktické bioinformatiky

Téma 9/10

Nukleotidová bioinformatika V

Cíle:

Student bude schopen navrhnout primery pro Pfu-mutagenezi a predikovat vazbu mikroRNA na vybraný gen.

„Bioinformatika nukleových kyselin V“

Vyhledávání NK sekvencí

Analýza vlastností sekvencí-složení, reverse complement, identifikace restrikčních míst

Práce s kódující DNA=práce s proteiny / překlad DNA sekvence-otvírání čtecího rámce

Klonování, návrh primerů pro PCR, **mutační primery**, rt-PCR, kontrola primerů

Předpověď sekundárních struktur

Porovnávání sekvencí, identifikace neznámé sekvence

Vyhledání SNPs

„čtení“ sekvenačních dat a spojování fragmentů

Vyhledávání hladin expresí jednotlivých genů

mikroRNA

Celé genomy

….

Klonování

Sekvenování-nezávislé na čtecím rámci

Specifické (např. analýza promotorové oblasti, 3´UTR…)

Exprese-příprava rekombinantního proteinu-nutné dodržet čtecí rámec

Mutageneze

Klonování-Návrh primerů – Pfu mutageneze

Bodová záměna kódující sekvence

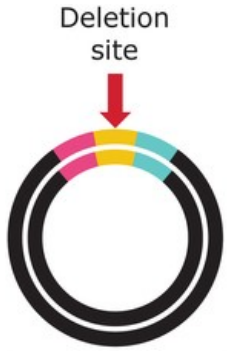
Mutace cílového místa pro RE, mikroRNA....

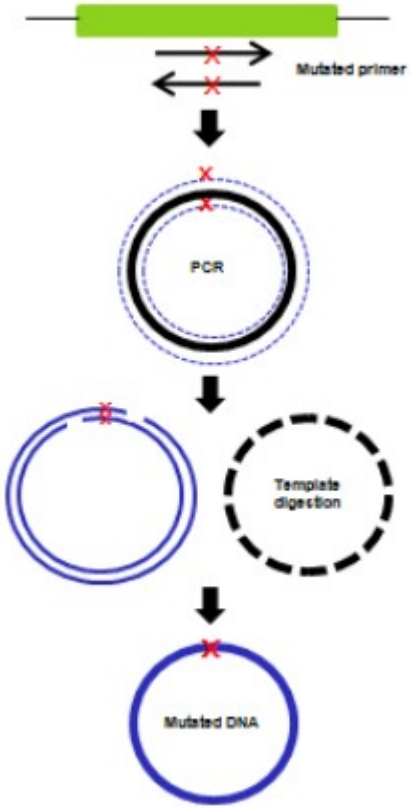
(site-directed mutagenesis)

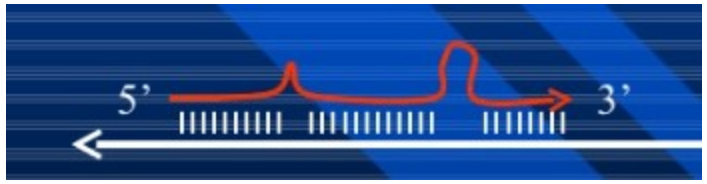
- Sekvenci máme v plasmidu (<10kB)

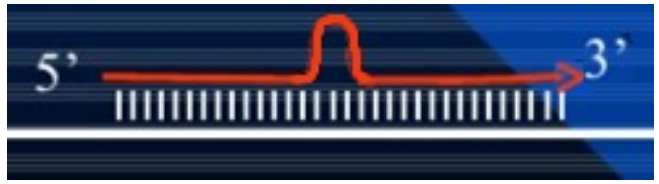
→ návrh mutačních primerů (F+R)

=téměř komplementární sekvence s mutací „uprostřed“ a stejnými úseky na obě strany…cca 15nt









Klonování-Návrh primerů

Bodová záměna kódující sekvence

Mutace cílového místa pro RE, mikroRNA….

(site-directed mutagenesis)

Postup: 1) Sekvenci naklonujeme do vhodného plasmidu (<10kb)

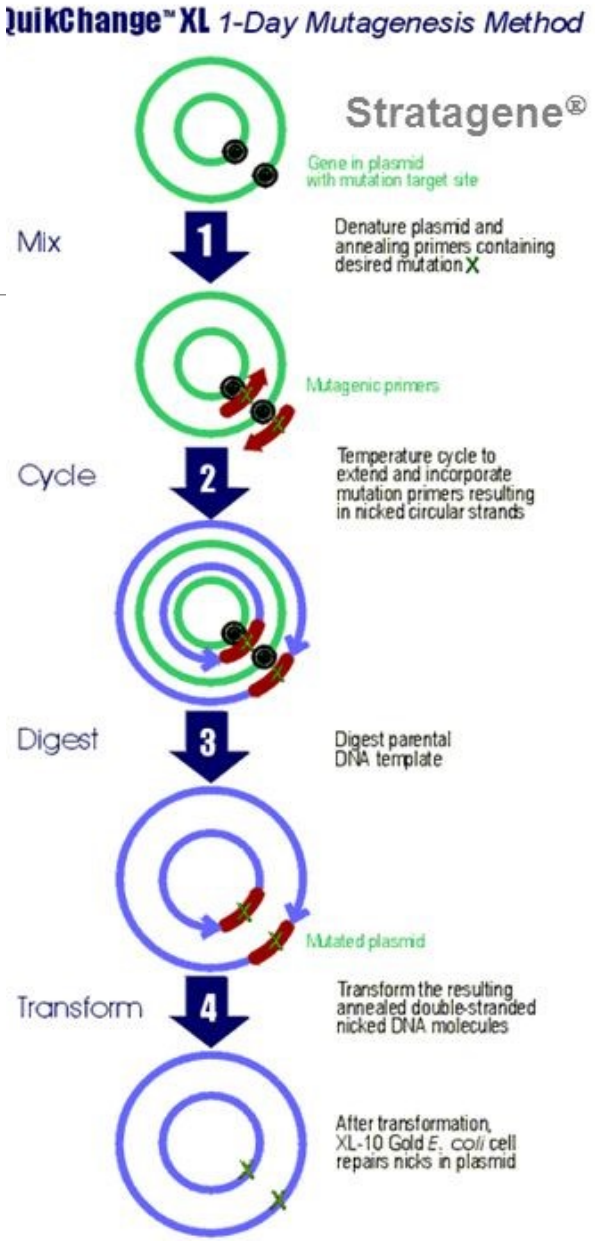
→ Návrh dvou mutačních primerů

2) PCR s těmito primery a plasmidem izolovaným z *E.coli* (templát)-po kontrole sekvence

→vytvoří se nové „cirkulární“ DNA k sobě komplementární, nesoucí mutaci v požadovaném místě, přerušené na „začátku“ primerů (tzv nick)

3) ošetření restrikční endonukleázou DpnI (štěpí pouze metylovanou DNA, tedy templátový plasmid)

4) transformace do bakterií (dokážou propojit jednořetězcové zlomy) a namnožení mutovaného cirkulárního plasmidu (→kontrola mutace sekvenací)



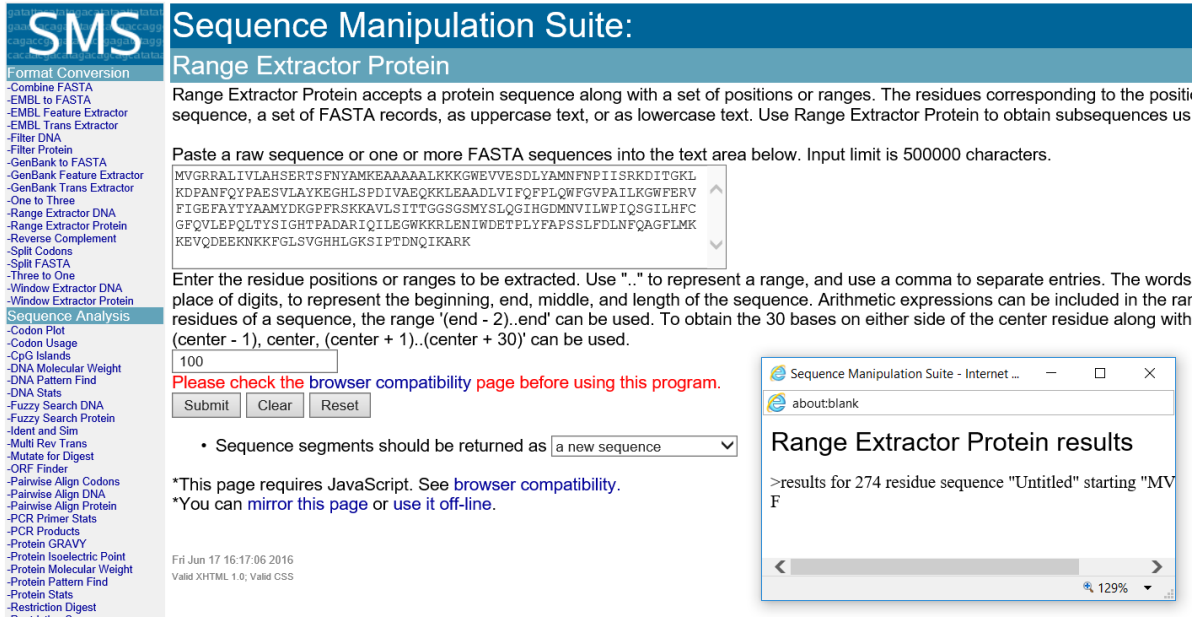
Klonování-Návrh primerů

POZOR: Při vkládání sekvence ve FASTA formátu je lepší za názvem vložit „enter“. Někdy nerozpozná program nový řádek.

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

-identifikace 100.AMK (SMS/ range extractor **Protein**…“100“)

-zápis příslušné mutace: →NQO1: mutace: „**F100G**“ = mutace fenylalaninu na glycin



Klonování-Návrh primerů

POZOR: Při vkládání sekvence ve FASTA formátu je lepší za názvem vložit „enter“. Někdy nerozpozná program nový řádek.

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

→ mutace fenylalaninu na glycin F(TTC) na G(GGC)

-Identifikace příslušného kodonu (SMS/DNA range extractor…“298..300 “)

vložit CDS

SMS

Sequence Manipulation Suite:

Range Extractor DNA

Format Conversion
-Combine FASTA
-EMBL to FASTA
-EMBL Feature Extractor
-EMBL Trans Extractor
-Filter DNA
-Filter Protein
-GenBank to FASTA
-GenBank Feature Extractor
-GenBank Trans Extractor
-One to Three
-Range Extractor DNA
-Range Extractor Protein
-Reverse Complement
-Split Codons
-Split FASTA
-Three to One
-Window Extractor DNA
-Window Extractor Protein

Sequence Analysis
-Codon Plot
-Codon Usage
-CpG Islands
-DNA Molecular Weight
-DNA Pattern Find
-DNA Stats
-Fuzzy Search DNA
-Fuzzy Search Protein
-Ident and Sim
-Multi Rev Trans
-Mutate for Digest
-ORF Finder
-Pairwise Align Codons
-Pairwise Align DNA
-Pairwise Align Protein
-PCR Primer Stats
-PCR Products
-Protein GRAVY
-Protein Isoelectric Point
-Protein Molecular Weight
-Protein Pattern Find
-Protein Stats
-Restriction Digest

Range Extractor DNA accepts a DNA sequence along with a set of positions or ranges. The bases corresponding to the positions or ranges are returned, either as lowercase text. Use Range Extractor DNA to obtain subsequences using position information.

Paste a raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 500000 characters.

```
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACC
TAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCT
TTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

Enter the base positions or ranges to be extracted. Use ".." to represent a range, and use a comma to separate entries. The words 'start', 'end', 'center', and 'length' of the sequence. Arithmetic expressions can be included in the ranges. For example, to obtain the last three bases of a sequence, the range '(end - 2)..end' the center base, the ranges '(center - 30)..(center - 1), center, (center + 1)..(center + 30)' can be used.

298..300

Please check the browser compatibility page before using this program.

Submit Clear Reset

- Obtain bases from the direct strand.
- Sequence segments should be returned as a new sequence

*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

Fri Jun 17 16:17:06 2016
Valid XHTML 1.0; Valid CSS

Sequence Manipulation Suite - Internet Explorer

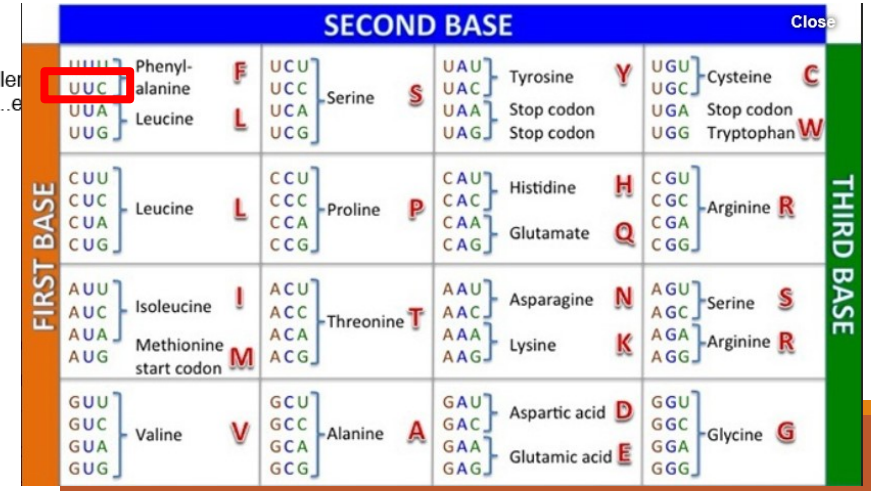
about:blank

Range Extractor DNA results

>results for 825 residue sequence "Untitled" starting "ATGGTCGGCA"
TTC

100%

1..3 1. kodon (ATG)
4..6 2. kodon
7..9 3. kodon
..
298..300 100.kodon

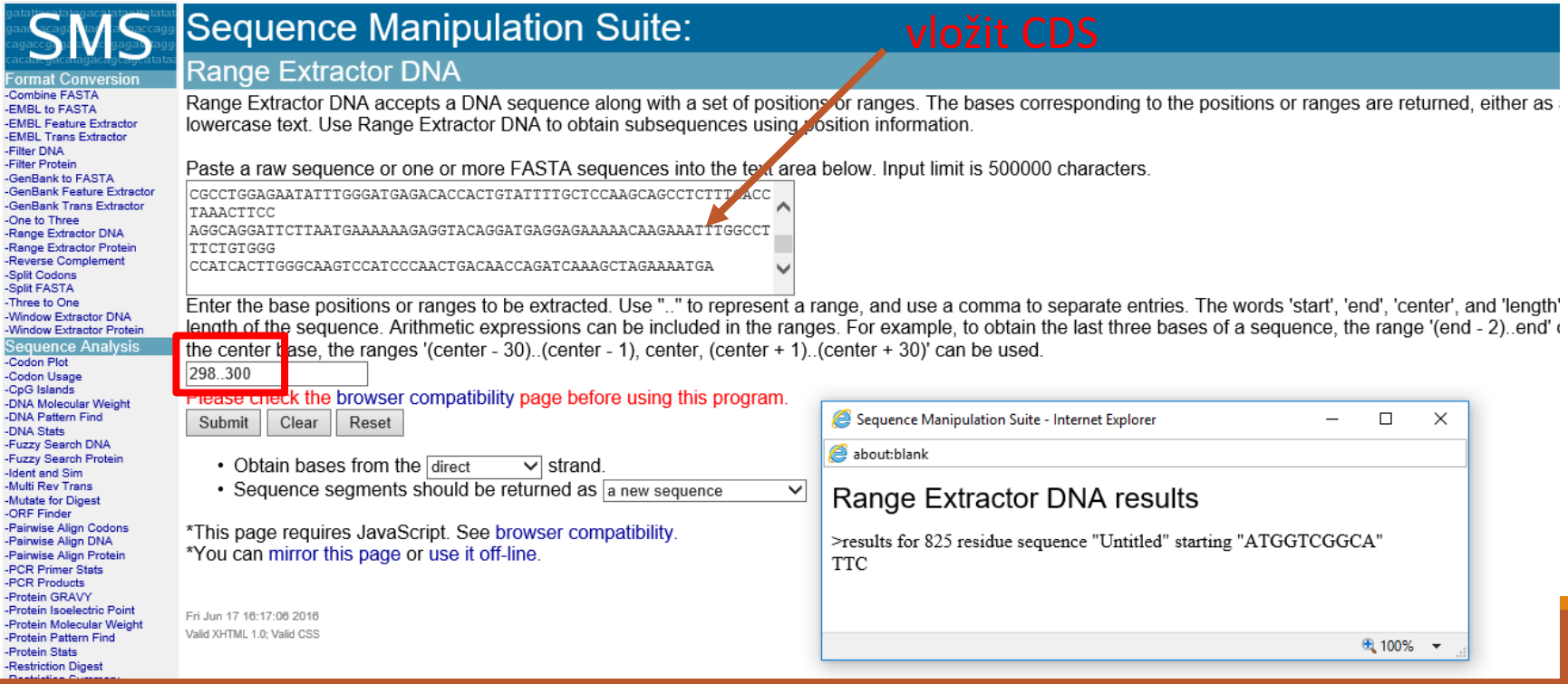


Klonování-Návrh primerů

POZOR: Při vkládání sekvence ve FASTA formátu je lepší za názvem vložit „enter“. Někdy nerozpozná program nový řádek.

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G) → mutace fenylalaninu na glycin

-Identifikace příslušného kodonu (SMS/DNA range extractor…“298..300 “)



→Pro NQO1: mutace: „F100G“

1..3 1. kodon (ATG)
4..6 2. kodon
7..9 3. kodon
..
298..300 100.kodon

Vyzkoušejte si....

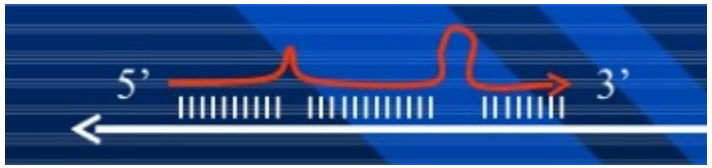
→identifikujte 100. aminokyselinu ve vašem proteinu
→jaký triplet jí kóduje

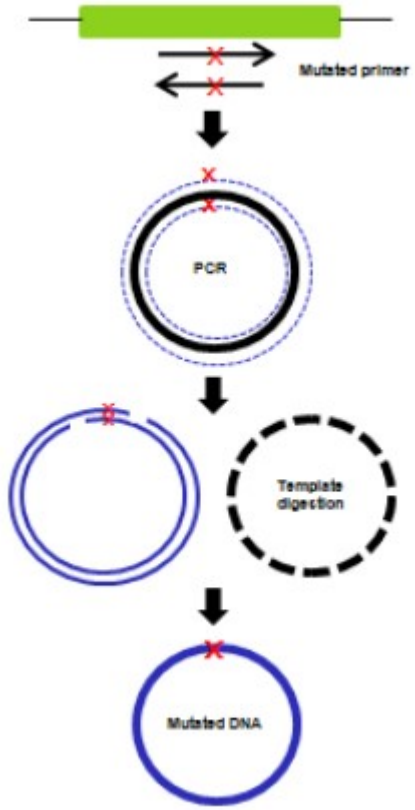
Klonování-Návrh primerů – Pfu mutageneze

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

-identifikace 100.AMK (SMS/protein range extractor…“100“)

-kontrola v proteinové sekvenci: (př. F100G)





Klonování-Návrh primerů

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

-“vytažení“ potřebného úseku pro návrh primerů:

SMS/DNA range extractor…“ 283..315 „ (při vložení CDS)

5 kodonů	mutace	5kodonů
283..297	298..300	301..315

SMS

Format Conversion
-Combine FASTA
-EMBL to FASTA
-EMBL Feature Extractor
-EMBL Trans Extractor
-Filter DNA
-Filter Protein
-GenBank to FASTA
-GenBank Feature Extractor
-GenBank Trans Extractor
-One to Three
-Range Extractor DNA
-Range Extractor Protein
-Reverse Complement
-Split Codons
-Split FASTA
-Three to One
-Window Extractor DNA
-Window Extractor Protein
Sequence Analysis
-Codon Plot
-Codon Usage
-CpG Islands
-DNA Molecular Weight
-DNA Pattern Find
-DNA Stats
-Fuzzy Search DNA
-Fuzzy Search Protein
-Ident and Sim
-Multi Rev Trans
-Mutate for Digest
-ORF Finder
-Pairwise Align Codons
-Pairwise Align DNA
-Pairwise Align Protein
-PCR Primer Stats
-PCR Products
-Protein GRAVY
-Protein Isoelectric Point
-Protein Molecular Weight
-Protein Pattern Find
-Protein Stats

Sequence Manipulation Suite:

Range Extractor DNA

Range Extractor DNA accepts a DNA sequence along with a set of positions or ranges. The bases corresponding to the positions or ranges are returned, eithe
lowercase text. Use Range Extractor DNA to obtain subsequences using position information.

Paste a raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 500000 characters.

```
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACC
TAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCT
TTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

Enter the base positions or ranges to be extracted. Use ".." to represent a range, and use a comma to separate entries. The words 'start', 'end', 'center', and 'le
uence. Arithmetic expressions can be included in the ranges. For example, to obtain the last three bases of a sequence, the range '(end - 2)..
the ranges '(center - 30)..(center - 1), center, (center + 1)..(center + 30)' can be used.

283..315

Please check the browser compatibility page before using this program.

Submit Clear Reset

- Obtain bases from the direct strand.
- Sequence segments should be returned as a new sequence

*This page requires JavaScript. See browser compatibility.
*You can mirror this page or use it off-line.

Fri Jun 17 16:17:06 2016
Valid XHTML 1.0; Valid CSS

Sequence Manipulation Suite - Internet Explorer

about:blank

Range Extractor DNA results

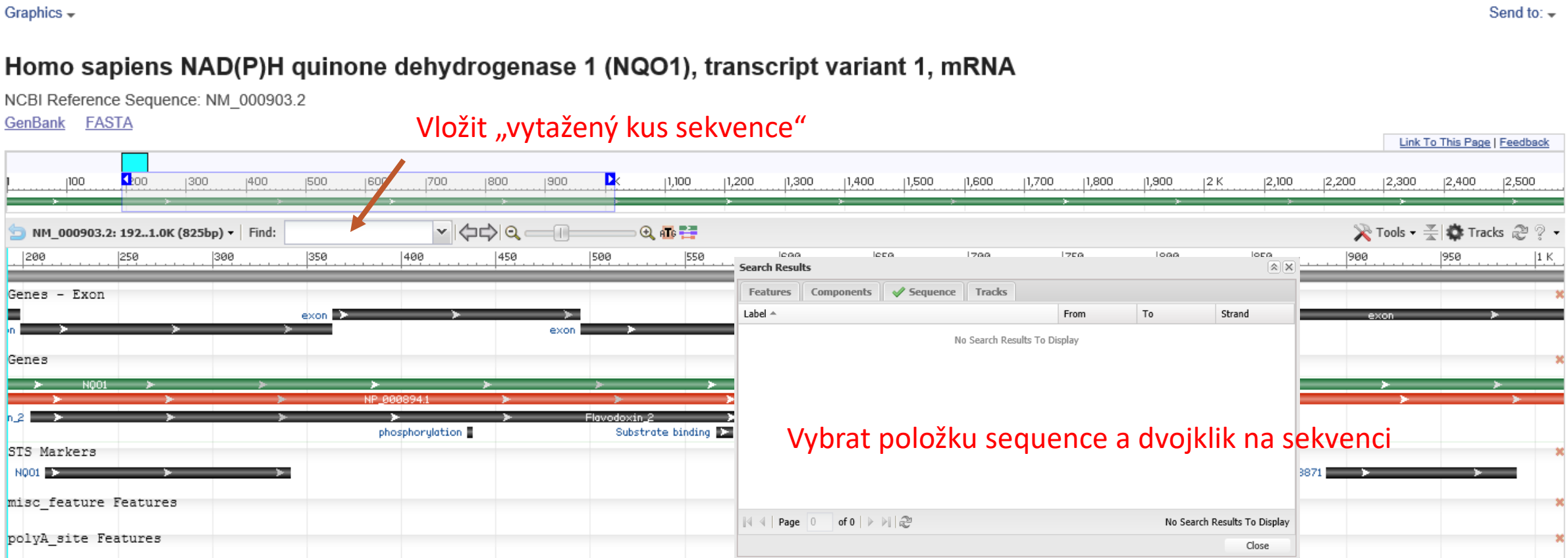
>results for 825 residue sequence "Untitled" starting "ATGGTCGGCA"
GACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAG

100%

Klonování-Návrh primerů

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

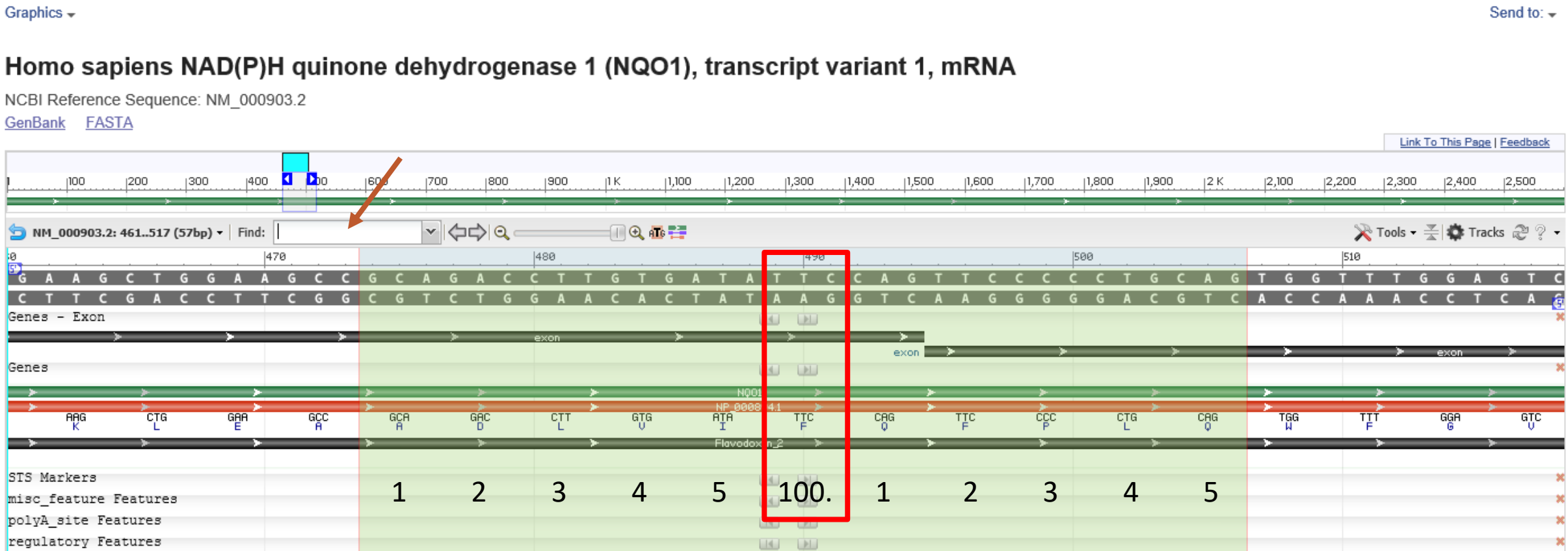
Kontrola: „náhled“ sekvence: NCBI Graphic



Klonování-Návrh primerů

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

Kontrola: „náhled“ sekvence: NCBI Graphic



Vyzkoušejte si....

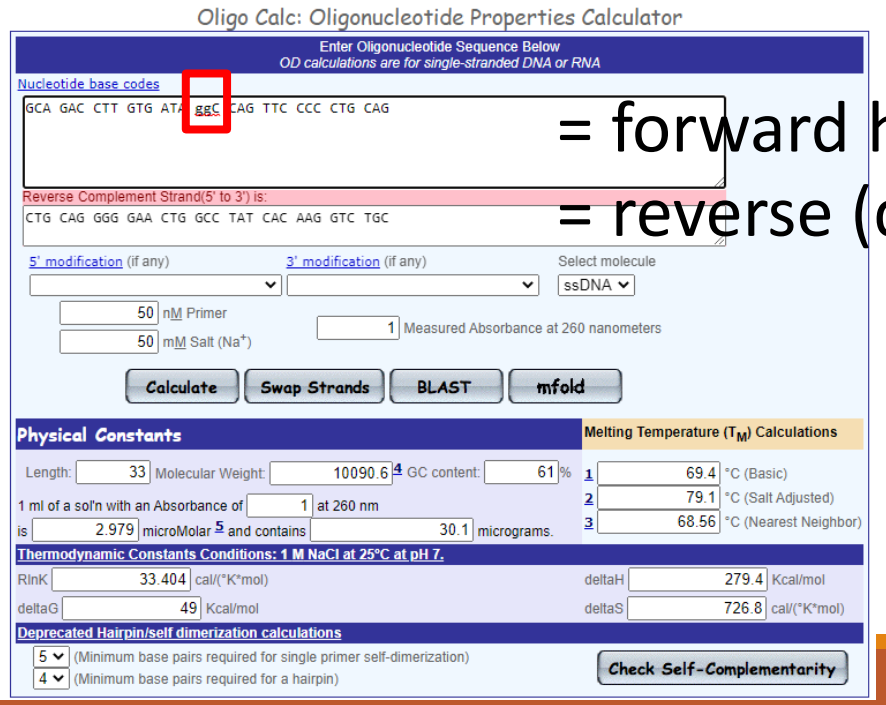
….navrhnout primery pro mutaci 100.AMK vašeho proteinu

→identifikujte, o kterou AMK se jedná (a jakým triplet jí přísluší) √
→vyberte úsek DNA sekvence pro návrh primerů

Klonování-Návrh primerů

Zadání: „mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

Rozdělení na kodony a identifikace potřebného kodonu(OligoCalc)



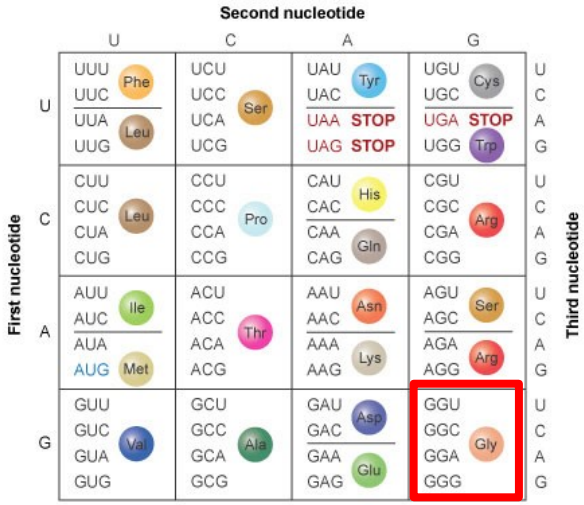
= forward horní primer

= reverse (dolní) primer

→manuálně mutovat F(TTC) na G(GGC)

Codon usage (NQO1)

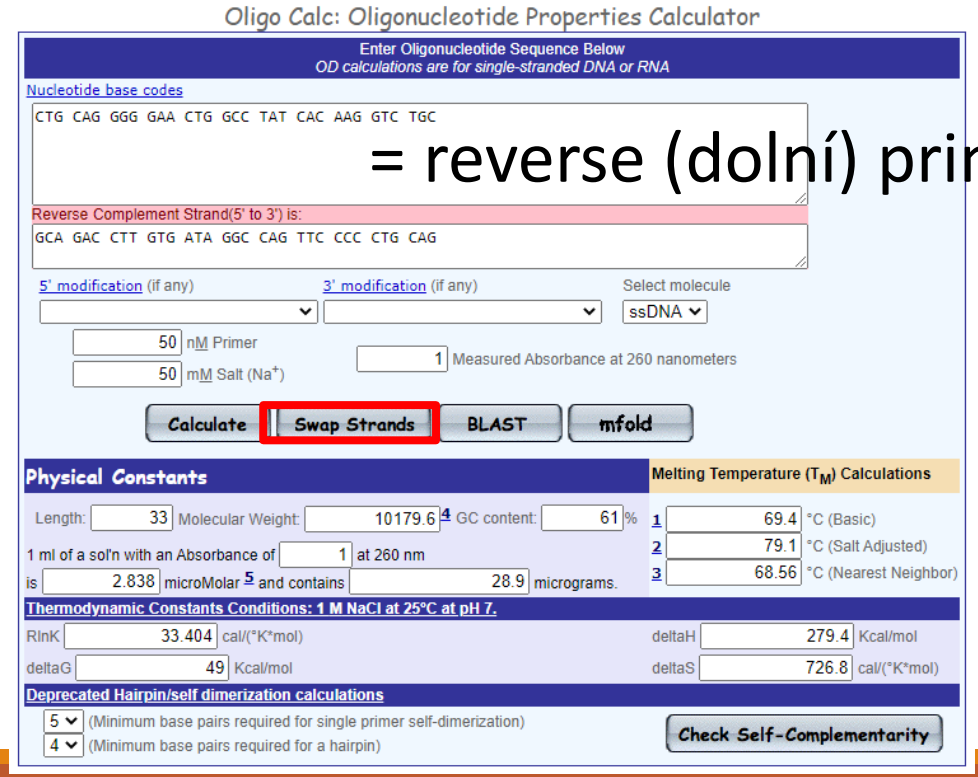
Gly	GGG	3.00
Gly	GGA	6.00
Gly	GGT	2.00
Gly	GGC	10.00



Klonování-Návrh primerů

„mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

Rozdělení na kodony a identifikace potřebného kodonu(OligoCalc)



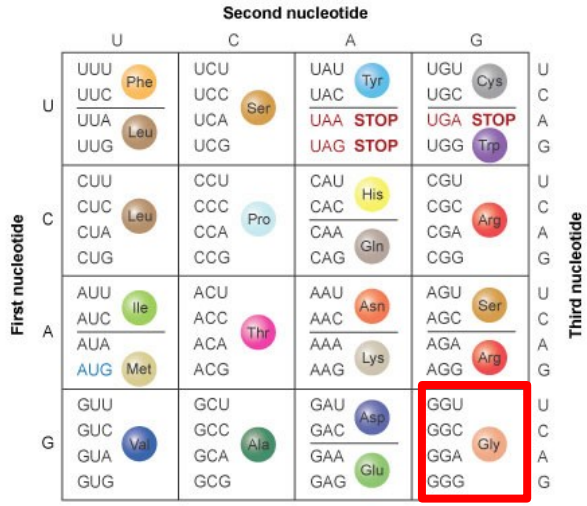
= reverse (dolní) primer

→manuálně mutovat F(TTC) na G(GGC)

→SWAP STRANDS (výměna řetězců mezi okny)

Codon usage (NQO1)

Gly	GGG	3.00
Gly	GGA	6.00
Gly	GGT	2.00
Gly	GGC	10.00



Courier New: suitable font for typing DNA sequence

Klonování-Návrh primerů

„mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

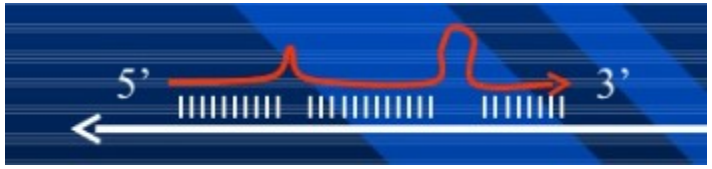
→manuálně mutovat F(TTC) na G(GGC)

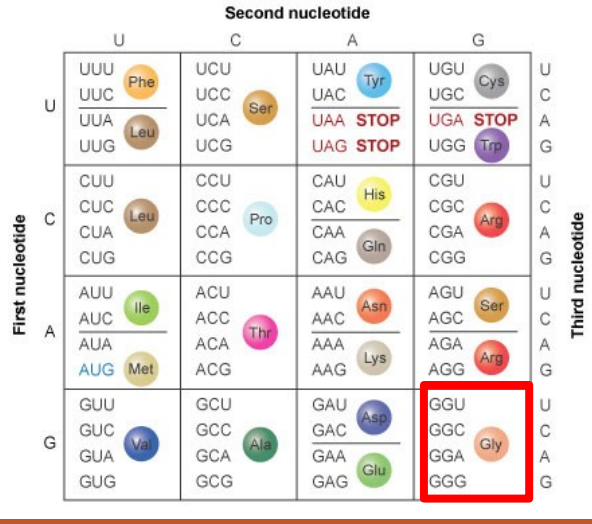
Pro NQO1: mutace: „F100G“

GCA GAC CTT GTG ATA TTC CAG TTC CCC CTG CAG

GCA GAC CTT GTG ATA GGC CAG TTC CCC CTG CAG

F primer: GCA GAC CTT GTG ATA GGC CAG TTC CCC CTG CAG





Courier New: suitable font for typing DNA sequence

Klonování-Návrh primerů

„mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

→manuálně mutovat F(TTC) na G(GGC)

Pro NQO1: mutace: „F100G“

GCA GAC CTT GTG ATA TTC CAG TTC CCC CTG CAG

F primer: GCA GAC CTT GTG ATA GGC CAG TTC CCC CTG CAG

R primer: CTG CAG GGG GAA CTG GCC TAT CAC AAG GTC TGC

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

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

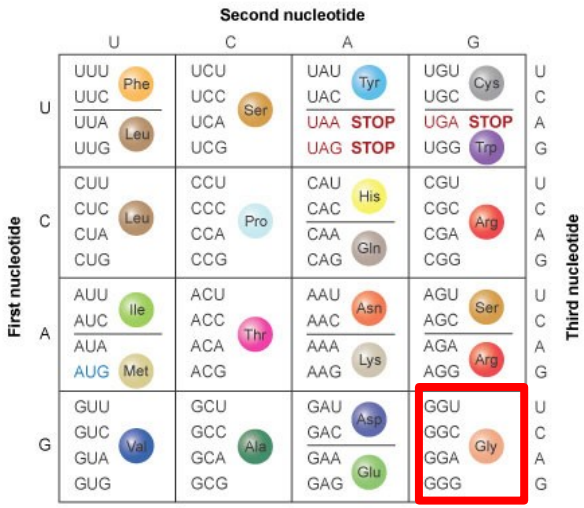
Nucleotide base codes

CTG CAG GGG GAA CTG GCC TAT CAC AAG GTC TGC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

GCA GAC CTT GTG ATA GGC CAG TTC CCC CTG CAG

Pro opačný řetězec (reverse complement /swap strands)



Vyzkoušejte si....

….navrhnout primery pro mutaci 100.AMK vašeho proteinu

→identifikujte, o kterou AMK se jedná (a jakým triplet jí přísluší) √
→vyberte úsek DNA sekvence pro návrh primerů √
→navrhněte F i R mutační primer

DÚ9

1) Navrhněte primery programem Primer3 na „váš“ gen, tak aby nebyly ve vlásenkových oblastech (mfold)

a zkontrolujte specifitu (specifické být nutně nemusí) – zapište výsledek

2) Navrhněte mutační primery pro mutaci 100. aminokyseliny "vašeho" proteinu:

- identifikujte 100. AMK (X), zapište plánovanou mutaci ve tvaru: X100G
- identifikujte příslušný kodon
- navrhněte mutační primery se záměnou v glycin (GGC)