Základy praktické Bioinformatiky

PETRA MATOUŠKOVÁ

2024/2025

ad DU7

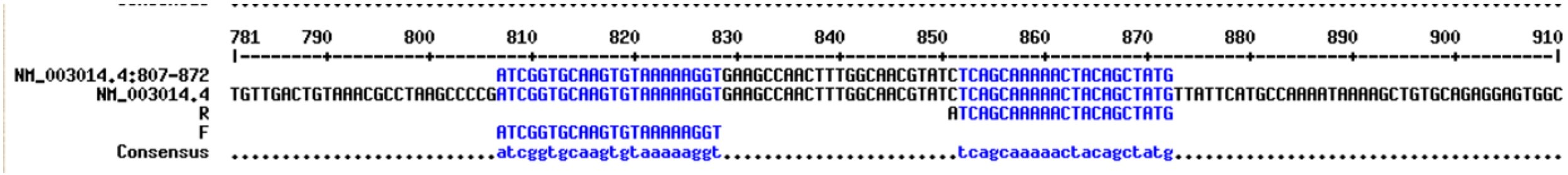
časté: primer R byl jen opsaný kus sekvence (musí být na opačný řetězec!)

ATCGGTGCAAGTGTAAAAAGGTGAAGCCAACTTTGGCAACGTATCTCAGCAAAAACTACAGCTATG

Forward primer: ATC GGT GCA AGT GTA AAA AGG T

Reverse primer: ATC AGC AAA AAC TAC AGC TAT G X

Pouze pro kontrolu dané sekvence: R primer je potřeba reversně komplementární (R_rc):



Procvičování návrh primerů:

1) Vyberte, které primery jsou vhodné pro amplifikaci celého zadaného úseku:

```
>sekvence
GTGTCCCTGGTGGTGAATGTGGCCAGCGAGTGCGGCTTCACAGACCAGCACTACCGAGCCCTGCAGCAGC
TGCAGCGAGACCTGGGCCCCCACCACTTTAACGTGCTCGCCTTCCCCTGCAACCAGTTTGGCCAACAGGA
GCCTGACAGCAACAAGGAGATTGAGAGCTTTGCCCGCCGCACCTACAGTGTCTCATTCCCCATGTTTAGC
AAGATTGCAGTCACCGGTACTGGTGCCCATCCTGCCTTCAAGTACCTGGCCC
```

A)
F: GTGTCCCTGGTGGTGAATG
R: CCAGGTACTTGAAGGCAGG

B)
F: TCCCTGGTGGTGAATGTG
R: CCTTCAAGTACCTGGCCC

C)
F: GTGTCCCTGGTGGTGAATG
R: GGGCCAGGTACTTGAAGG

D)
F: GTGTCCCTGGTGGTGAATG
R: CCTTCAAGTACCTGGCCC

řešení:

Základy praktické bioinformatiky

Téma 8/10

Nukleotidová bioinformatika IV

Cíle:

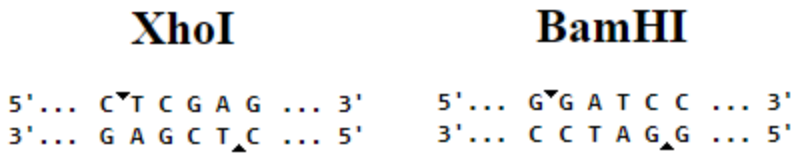
Student bude schopen udělat restrikční analýzu zadaného úseku, vybrat vhodné restrikční endonukleázy a navrhnout primery pro amplifikaci DNA s vloženými restrikčními místy pro následné klonování…

..a primery pro kvantitativní stanovení vybraného genu (qPCR).

Restrikční analýza

= hledání cílových míst restrikčních endonukláz

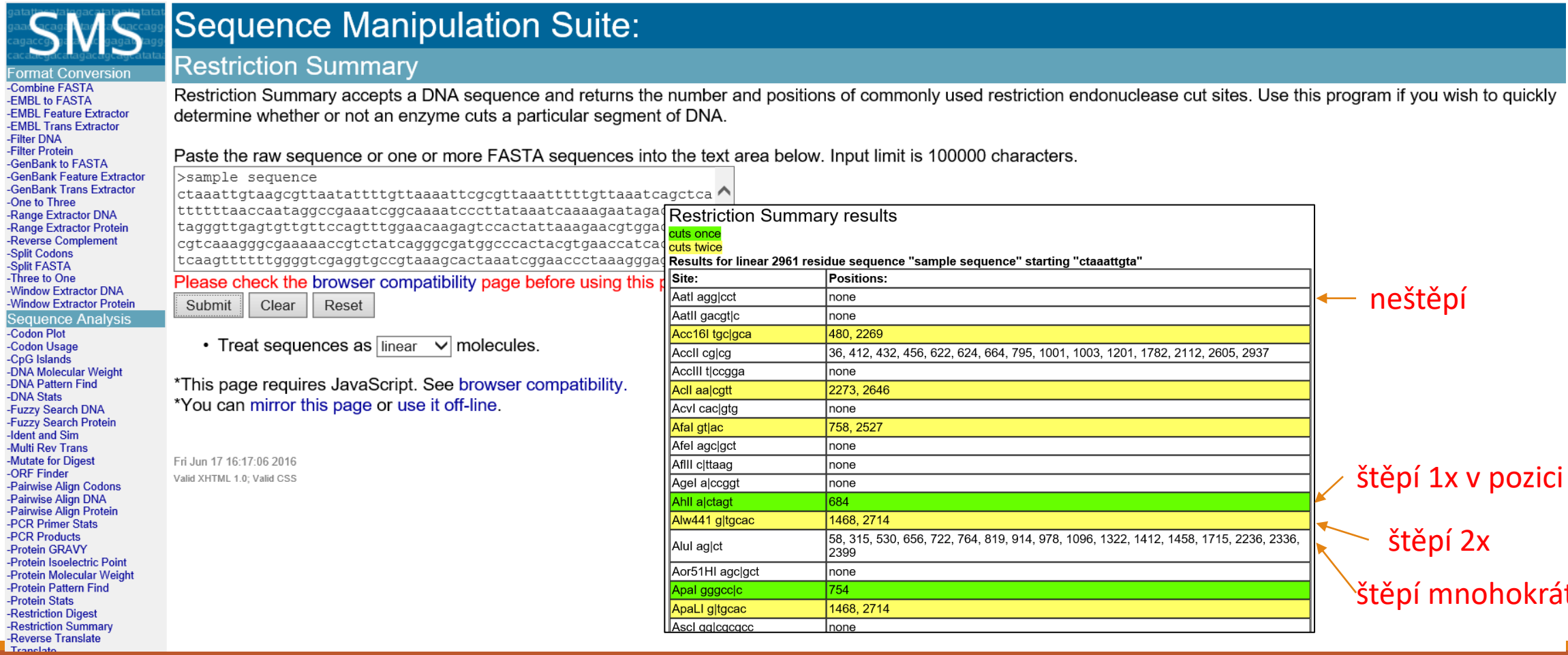
Např: XhoI CTCGAG; BamHI GGATCC (palindromy)



Důvody:

- pro kontrolu produktu po PCR
- analýza mutací
- před klonováním (!)

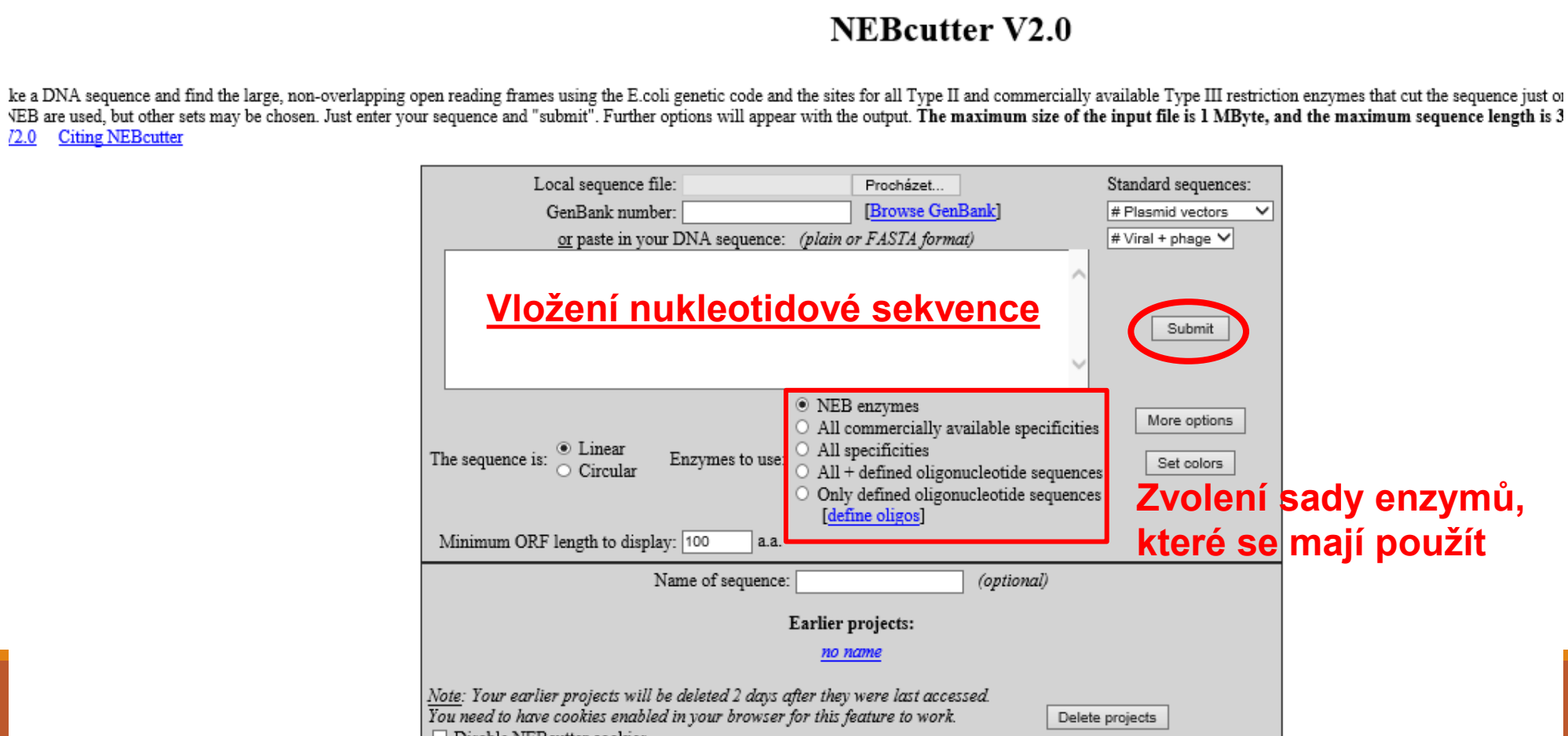
Restrikční analýza



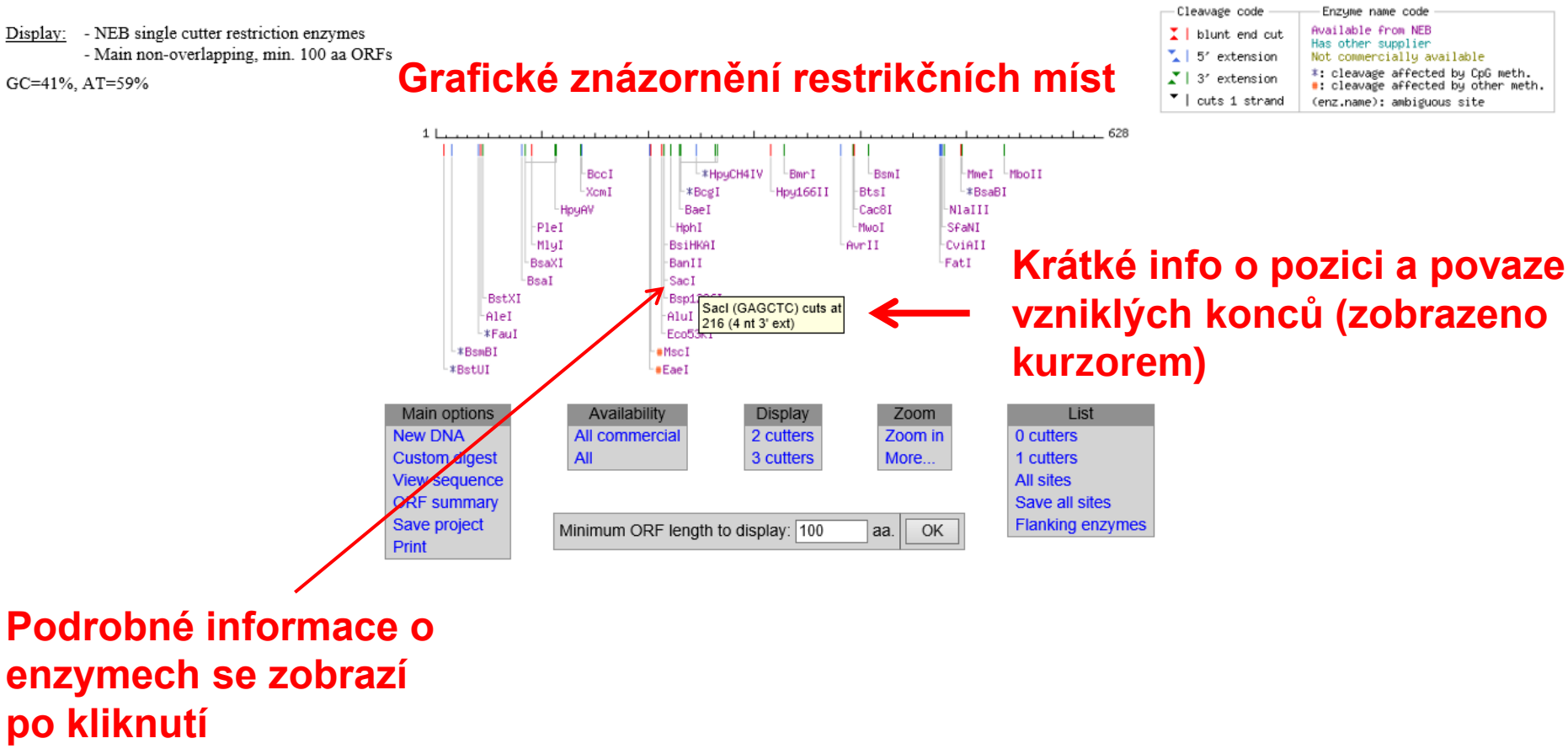
Restrikční analýza

http://nc2.neb.com/NEBcutter2/

NEBcutter



Restrikční analýza



Restrikční analýza

[Back to main display]

SacI

```
5'... G A G C T˅C ... 3'
3'... C˄T C G A G ... 5'
```

Grafické znázornění štěpícího místa

Available from NEB, Catalog # R0156
View product page | Time-Saver

SacI-HF (High-Fidelity version) NEB Catalog # R3156
View product page | Time-Saver Supplied with **CutSmart** buffer.

REBASE enzyme page | Methylation Sensitivity

Buffer name: NEBuffer 1.1
Main: 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl
pH: 7.0
Mg: 10 mM MgCl2
BSA: 100

Reaction temperature: 37 °C

Overlapping methylation:

NONE

Neoschizomers:

Eco53kI	5'... G A G˅C T C ... 3' 3'... C T C˄G A G ... 5'

Enzymy rozpoznávající sekvenci jako SacI →

Isoschizomers:

NONE

Sites in sequence: 1

End produced at 212:

3' overhang: AGCT

Enzymy produkující kompatibilní konce →

Enzymes producing compatible ends:

Those cutting *unnamed sequence*:

Enzyme	Specificity	Compatible sites	% activity in			
			1.1	2.1	3.1	CS
BanII	GRGCYC	all sites	100	100	50	100
BsiHKAI	GWGCWC	all sites	25	100	100	100
Bsp1286I	GDGCHC	all sites	25	25	25	100
SacI	GAGCTC	all sites	100	50	10	100

Vyzkoušejte si....

….udělejte restrikční analýzu „vašeho“ genu (celé CDS)

→ zjistěte, které neštěpí

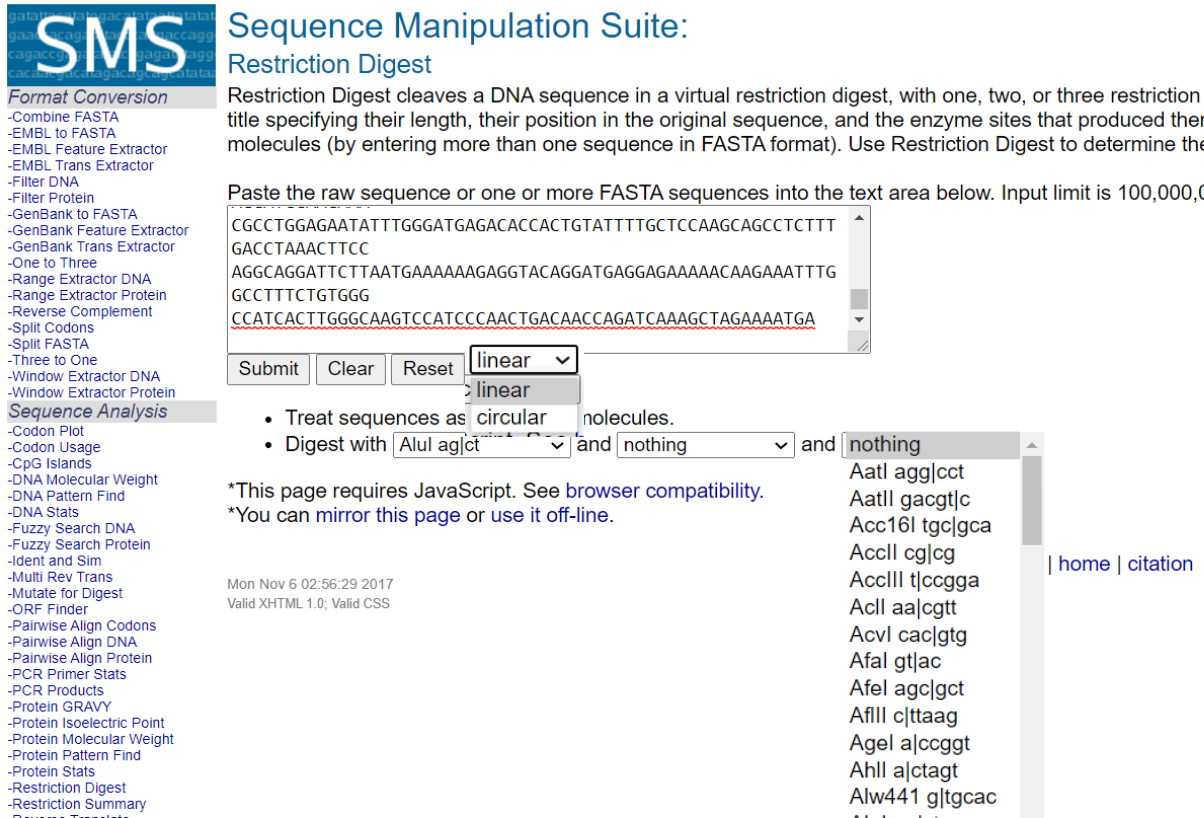
a které štěpí 1x, 2x…těmto RE je nutné se při klonování vyhnout

(DU: : XhoI, HindIII, SacI)

RA:kontrola PCR fragmentů

= simulace štěpení, co můžeme na gelu očekávat při separaci fragmentů po štěpení

Program SMS: „**Restriction digest**“



RA:kontrola PCR fragmentů

NQO1:CDS-restiction summary

```
>NM_000903.3:122-946 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1),
transcript variant 1, mRNA
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

HpaII c|cgg	415
EcoRI g|aattc	603
AluI ag|ct	274, 815

NQO1:CDS-restiction digest

Restriction Digest

Restriction Digest cleaves a DNA sequence in a virtual restriction digest, with one, two, or title specifying their length, their position in the original sequence, and the enzyme sites th molecules (by entering more than one sequence in FASTA format). Use Restriction Digest

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input

```
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTT
GACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTG
GCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

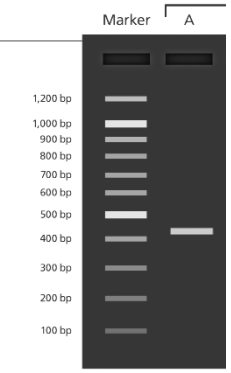
Submit Clear Reset

- Treat sequences as linear molecules.
- Digest with HpaII c|cgg and nothing and nothing .

```
>414 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTAT
GCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCG
GACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTG
AAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCAT
CTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTC
CAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTG
TTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTC

>411 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
CGGAGTAAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTG
CAAGGGATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCAT
TTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCA
GACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAG
ACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAGGATTCTTA
ATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGGCCAT
CACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

A: 414+ 411nt

NQO1:CDS (825nt)



EcoRI

```
>602 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTAT
GCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCG
GACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTG
AAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCAT
CTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTC
CAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTG
TTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGG
ATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGT
GGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCC
CG

>223 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
AATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACT
GTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAGGATTCTTAATGAAAAA
AGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGGCCATCACTTGGG
CAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

B: 602+ 223nt

NQO1:CDS (825nt)

RA:kontrola PCR fragmentů

- Treat sequences as linear molecules.
- Digest with EcoRI g|aattc and HpaII c|cgg and nothing .

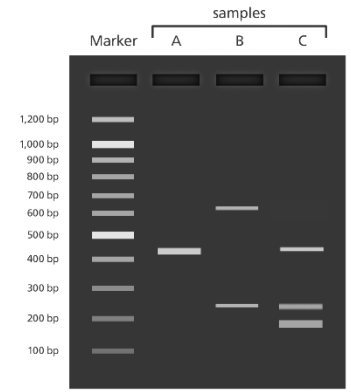
NQO1:CDS-restiction digest

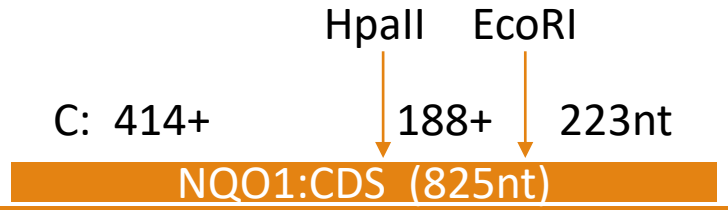
>NM_000903.3:122-946 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA

```
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

HpaII c|cgg	415
EcoRI g|aattc	603
AluI ag|ct	274, 815

```
>414 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTAT
GCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCG
GACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTG
AAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCAT
CTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTC
CAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTG
TTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTC

>223 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
AATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACT
GTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAGGATTCTTAATGAAAAA
AGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGGCCATCACTTGGG
CAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA

>188 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
CGGAGTAAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTG
CAAGGGATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCAT
TTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCA
GACGCCCG
```





RA:kontrola PCR fragmentů

NQO1:CDS-restiction digest

```
>NM_000903.3:122-946 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1),
transcript variant 1, mRNA
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

HpaII c|cgg	415

EcoRI g|aattc	603

AluI ag|ct	274, 815

Restriction Digest

Restriction Digest cleaves a DNA sequence in a virtual restriction digest, with one, two, or title specifying their length, their position in the original sequence, and the enzyme sites th molecules (by entering more than one sequence in FASTA format). Use Restriction Digest

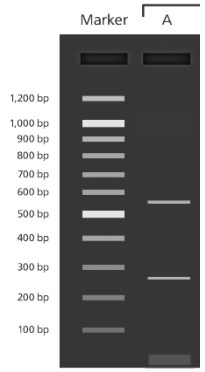
Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input

```
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTT
GACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTG
GCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

Submit Clear Reset

- Treat sequences as linear molecules.
- Digest with AluI ag|ct and nothing and nothing .

```
>541 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
CTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCC
ATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCC
ATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGTAAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGC
AGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCA
ATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATAT
AGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGC
CTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTA
AACTTCCAGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAA
TTTGGCCTTTCTGTGGGCCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAA
G

>273 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTAT
GCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCG
GACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTG
AAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCAT
CTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAG

>11 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946 [
CTAGAAAATGA
```



A: 273+ 541+ 11nt

NQO1:CDS (825nt)

RA:kontrola PCR fragmentů

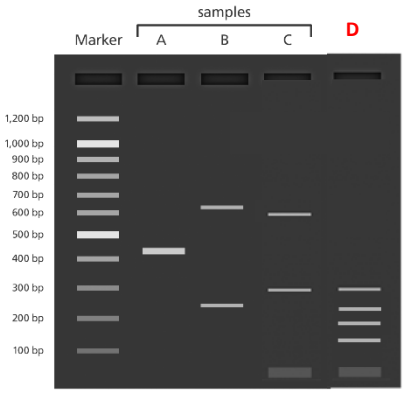
NQO1:CDS-restiction digest

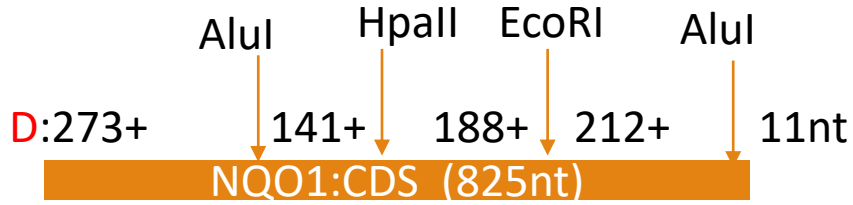
```
>NM_000903.3:122-946 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1),
transcript variant 1, mRNA
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

HpaII c|cgg	415
EcoRI g|aattc	603
AluI ag|ct	274, 815

- Treat sequences as linear molecules.
- Digest with EcoRI g|aattc and HpaII c|cgg and AluI ag|ct .

```
>273 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTAT
GCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCG
GACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTG
AAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCAT
CTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAG

>212 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
AATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACT
GTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAGGATTCTTAATGAAAAA
AGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGGCCATCACTTGGG
CAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAG

>188 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
CGGAGTAAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTG
CAAGGGATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCAT
TTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCA
GACGCCCG

>141 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946
CTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCC
ATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCC
ATGTATGACAAAGGACCCTTC

>11 bp linear fragment from linear parent NM_000903.3:122-946 F
CTAGAAAATGA
```





Vyzkoušejte si:

- Kolik fragmentů vznikne, štěpíte-li 3. exon referenčního genu lidské GPX7 enzymem MseI?
- Kolik fragmentů vznikne, štěpíte-li 3. exon referenčního genu lidské GPX7 enzymem MscI?

Vyzkoušejte si:

- Kolik fragmentů vznikne, štěpíte-li 3. exon referenčního genu lidské GPX7 enzymem MseI?
- Kolik fragmentů vznikne, štěpíte-li 3. exon referenčního genu lidské GPX7 enzymem MscI?

Homo sapiens glutathione peroxidase 7 (GPX7), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_015696.5

GenBank Graphics

```
>NM_015696.5:440-1229 Homo sapiens glutathione peroxidase 7 (GPX7), mRNA
AGACTTCTGGGAAGGAGCCCACCTGGAACTTCTGGAAGTACCTAGTAGCCCCAGATGGAAAGGTGGTAGG
GGCTTGGGACCCAACTGTGTCAGTGGAGGAGGTCAGACCCCAGATCACAGCGCTCGTGAGGAAGCTCATC
CTACTGAAGCGAGAAGACTTATAACCACCGCGTCTCCTCCTCCACCACCTCATCCCGCCCACCTGTGTGG
GGCTGACCAATGCAAACTCAAATGGTGCTTCAAAGGGAGAGACCCACTGACTCTCCTTCCTTTACTCTTA
TGCCATTGGTCCCATCATTCTTGTGGGGGAAAAATTCTAGTATTTTGATTATTTGAATCTTACAGCAACA
AATAGGAACTCCTGGCCAATGAGAGCTCTTGACCAGTGAATCACCAGCCGATACGAACGTCTTGCCAACA
AAAATGTGTGGCAAATAGAAGTATATCAAGCAATAATCTCCCACCCAAGGCTTCTGTAAACTGGGACCAA
TGATTACCTCATAGGGCTGTTGTGAGGATTAGGATGAAATACCTGTGAAAGTGCCTAGGCAGTGCCAGCC
AAATAGGAGGCATTCAATGAACATTTTTTGCATATAAACCAAAAAATAACTTGTTATCAATAAAAACTTG
CATCCAACATGAATTTCCAGCCGATGATAATCCAGGCCAAAGGTTTAGTTGTTGTTATTTCCTCTGTATT
ATTTTCTTCATTACAAAAGAAATGCAAGTTCATTGTAACAATCCAAACAATACCTCACGATATAAAATAA
AAATGAAAGTATCCTCCTCA
```

MscI tgg|cca	366
MseI t|taa	none

Restriction Digest

Restriction Digest cleaves a DNA sequence in a virtual restriction digest, with one, two, or three restriction e
that produced them. You can digest linear or circular molecules, and even a mixture of molecules (by enterir

Paste the raw sequence or one or more FASTA sequences into the text area below. Input limit is 100,000,0(

```
AAAAACTTG
CATCCAACATGAATTTCCAGCCGATGATAATCCAGGCCAAAGGTTTAGTTGTTGTTATTTC
CTCTGTATT
ATTTTCTTCATTACAAAAGAAATGCAAGTTCATTGTAACAATCCAAACAATACCTCACGAT
ATAAAATAA
AAATGAAAGTATCCTCCTCA
```

Submit Clear Reset

- Treat sequences as linear molecules.
- Digest with MscI tgg|cca and MseI t|taa and nothing .

*This page requir
*You can mirror th

Sun 1 Oct 12:00:07 2023
Valid XHTML 1.0; Valid CSS

Sequence Manipulation Suite – Škola – Microsoft Edge

about:blank

Restriction Digest results

```
>425 bp linear fragment from linear parent NM_015696.5:440-1229 H
CCAATGAGAGCTCTTGACCAGTGAATCACCAGCCGATACGAACGTCTTGCCAACAAAAAT
GTGTGGCAAATAGAAGTATATCAAGCAATAATCTCCCACCCAAGGCTTCTGTAAACTGGG
ACCAATGATTACCTCATAGGGCTGTTGTGAGGATTAGGATGAAATACCTGTGAAAGTGCC
TAGGCAGTGCCAGCCAAATAGGAGGCATTCAATGAACATTTTTTGCATATAAACCAAAAA
ATAACTTGTTATCAATAAAAACTTGCATCCAACATGAATTTCCAGCCGATGATAATCCAG
GCCAAAGGTTTAGTTGTTGTTATTTCCTCTGTATTATTTTCTTCATTACAAAAGAAATGC
AAGTTCATTGTAACAATCCAAACAATACCTCACGATATAAAATAAAAATGAAAGTATCCT
CCTCA

>365 bp linear fragment from linear parent NM_015696.5:440-1229 H
AGACTTCTGGGAAGGAGCCCACCTGGAACTTCTGGAAGTACCTAGTAGCCCCAGATGGAA
AGGTGGTAGGGGCTTGGGACCCAACTGTGTCAGTGGAGGAGGTCAGACCCCAGATCACAG
CGCTCGTGAGGAAGCTCATCCTACTGAAGCGAGAAGACTTATAACCACCGCGTCTCCTCC
TCCACCACCTCATCCCGCCCACCTGTGTGGGGCTGACCAATGCAAACTCAAATGGTGCTT
CAAAGGGAGAGACCCACTGACTCTCCTTCCTTTACTCTTATGCCATTGGTCCCATCATTC
TTGTGGGGGAAAAATTCTAGTATTTTGATTATTTGAATCTTACAGCAACAAATAGGAACT
CCTGG
```

Vyzkoušejte si:

Pomocí **Restriction summary** najděte RE, který štěpí 1x a další, který štěpí 2x, vyzkoušejte si kombinované štěpení v **Restriction Digest**

DU7:

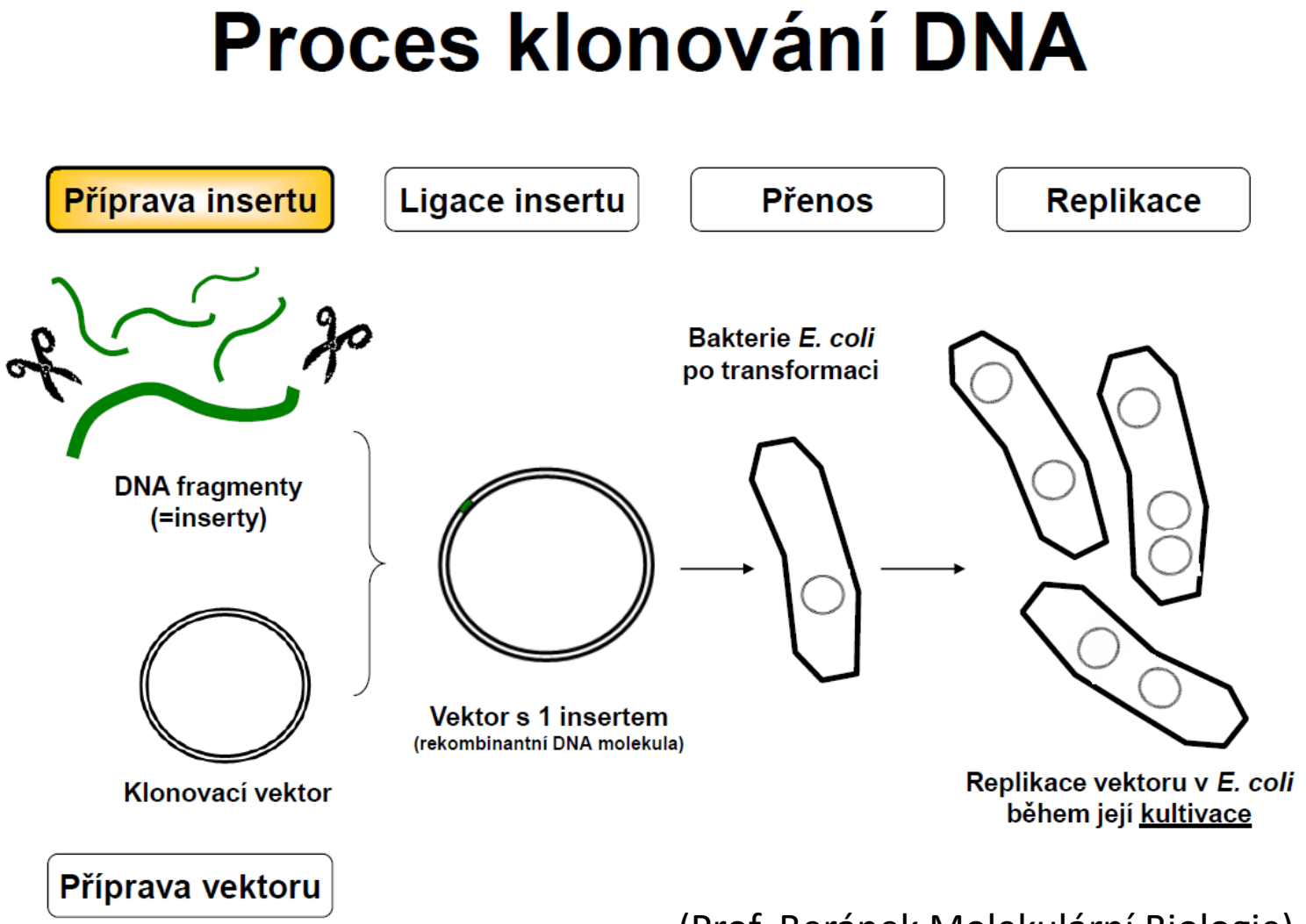
1) Zjistěte zda a kolikrát štěpí **CDS** sekvenci vašeho genu enzymy: XhoI, HindIII, SacI

2) Jaké fragmenty z vaší **CDS** vzniknou po štěpení všemi těmito enzymy?

3) vyberte RE, kterou byste štěpili vaši CDS jednou a výsledek na gelu by vhodně potvrdil vznik předpokládaného produktu

Klonování

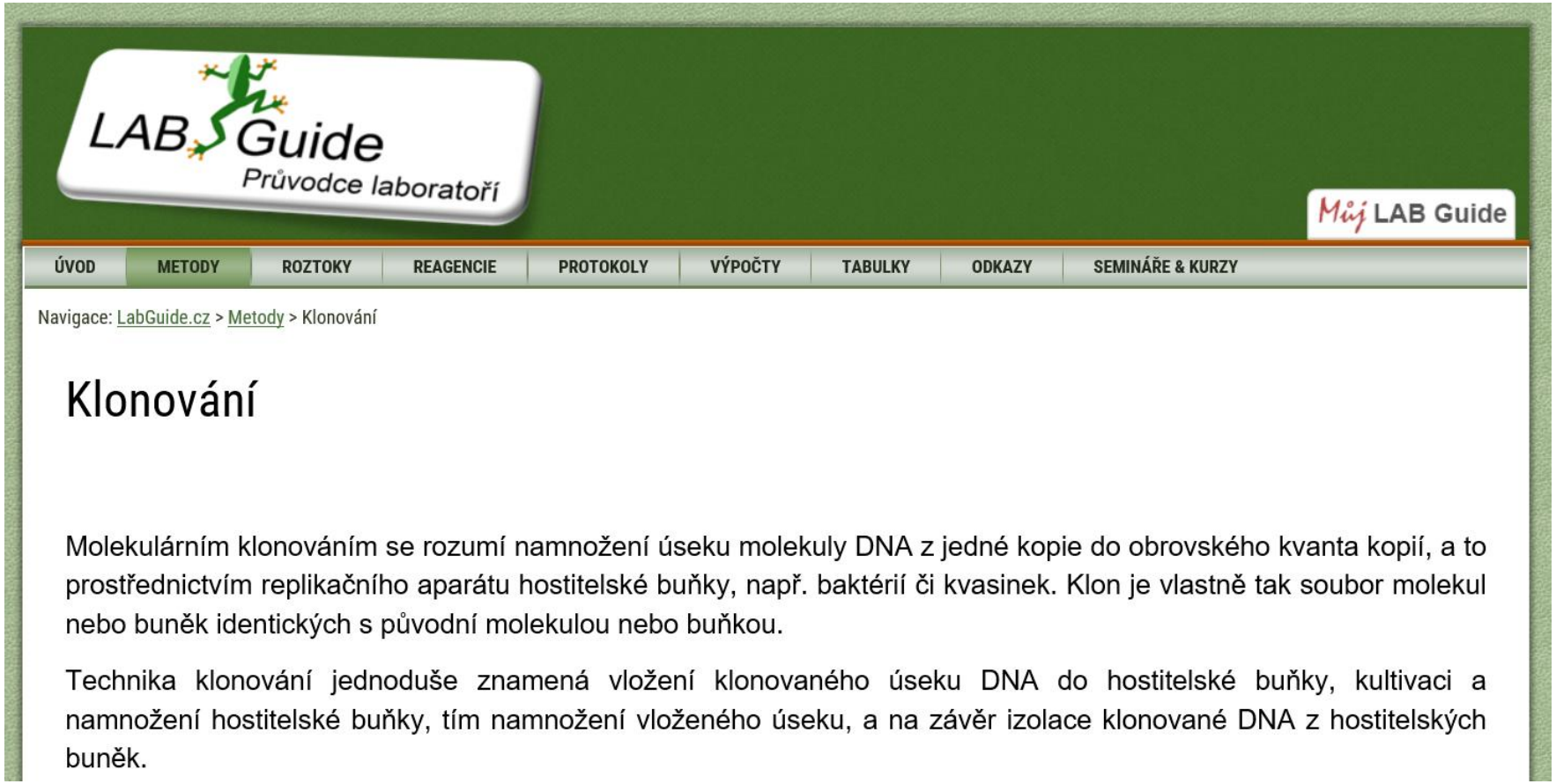
=namnožení úseku DNA



(Prof. Beránek Molekulární Biologie)

Klonování

Labguide.cz



Klonování

Namnožení úseku DNA (např. sekvenování určitého úseku, celé CDS…)

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

„Expresní“-příprava rekombinantního proteinu-nutné dodržet čtecí rámec

Mutageneze

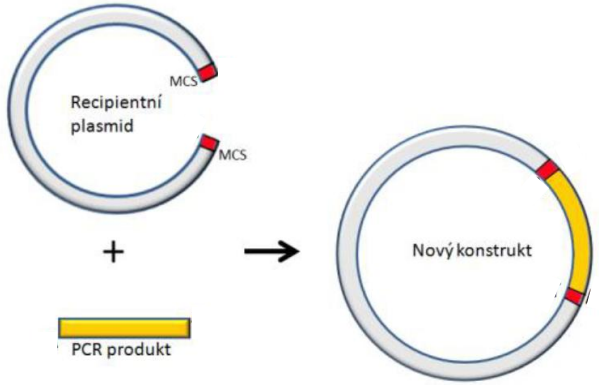
Klonování

Ne-specifické klonování pro namnožení úseku DNA (např. pro **sekvenování určitého úseku**, celé CDS…)

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“ **umíme**
- Klonování s tupými (zarovnanými) konci

  Forward -horní primer

  Reverse -dolní primer



>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA

ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA

Klonování

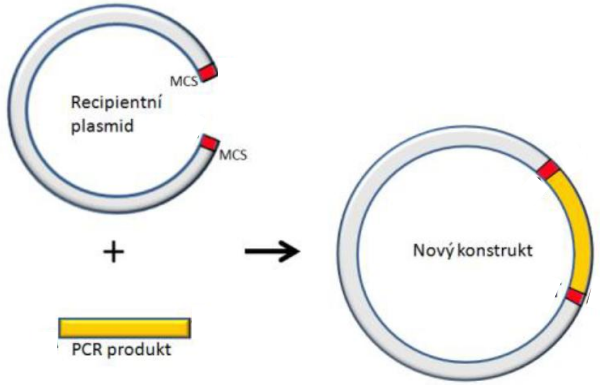
Ne-specifické klonování pro namnožení úseku DNA (např. pro **sekvenování určitého úseku**, celé CDS…)

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými (zarovnanými) konci

Forward -horní primer

→primer se „opíše“ – cca 20-22nt
→a zkontroluje

```
>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
(NQO1), transcript variant 1, mRNA
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```



Klonování

Ne-specifické klonování pro namnožení úseku DNA (např. pro **sekvenování určitého úseku**, celé CDS…)

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými (zarovnanými) konci

Forward -horní primer

Reverse -dolní primer

→ **celá sekvence „reverse complement“**

→primer se „opíše“ – cca 20-22 (18-24) nt

→a zkontroluje

>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA

ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA

→ primery je nutné „**vyladit**“ aby seděly Tm (prodloužením, či krácením podle sekvence)

Klonování

Ne-specifické klonování pro namnožení úseku DNA (např. pro **sekvenování určitého úseku**, celé CDS…)

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými (zarovnanými) konci

Forward -horní primer

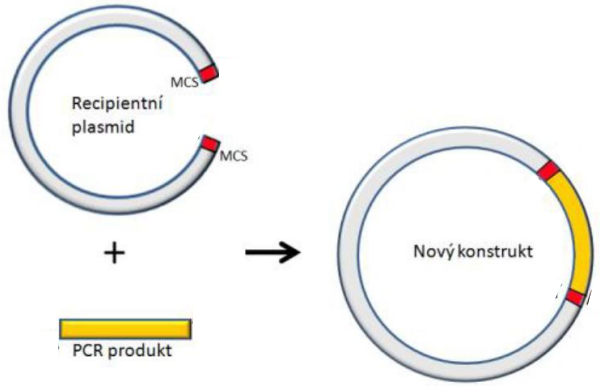
Reverse -dolní primer

→ **celá sekvence „reverse complement“**

→primer se „opíše“ – cca 20-22 (18-24) nt

→a zkontroluje

```
>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
(NQO1), transcript variant 1, mRNA
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```



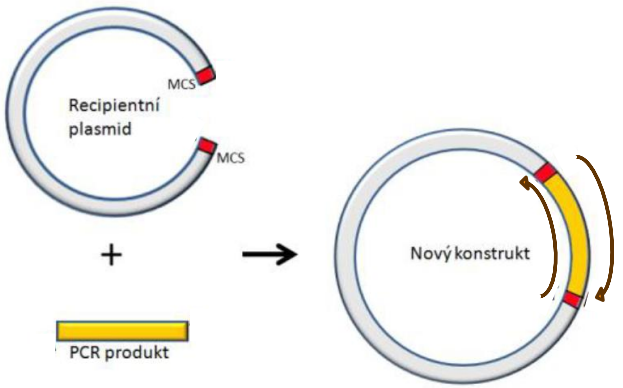
→ primery je nutné „**vyladit**“ aby seděly Tm (prodloužením, či krácením podle sekvence)

Klonování

Ne-specifické klonování pro namnožení úseku DNA (např. pro **sekvenování určitého úseku**, celé CDS…)

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými (zarovnanými) konci

Nevýhoda: nelze zajistit jakým „směrem“ je insert zaklonovaný



→ primery je nutné „**vyladit**“ aby seděly Tm (prodloužením, či krácením podle sekvence)

Klonování

Ne-specifické namnožení úseku DNA (např. sekvenování určitého úseku, celé CDS…)

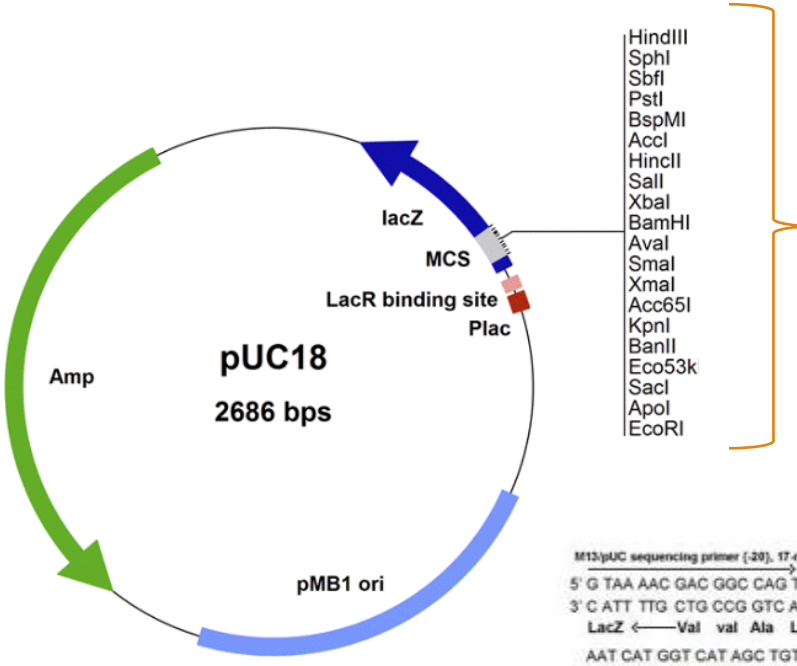
Specifické (např. klonování celé CDS, analýza promotorové oblasti, 3´UTR…) – potřebujeme „správný“ směr

„Expresní“-příprava rekombinantního proteinu-nutné dodržet čtecí rámec

Mutageneze

Klonování

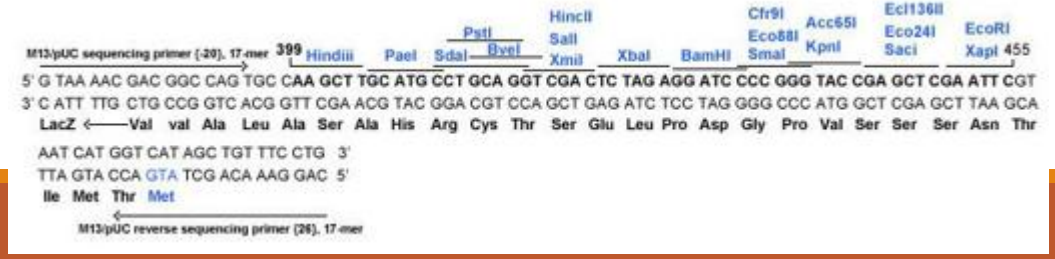
Specifické (např. klonování celé CDS, analýza promotorové oblasti, 3´UTR…)



MCS (multiple cloning site)=polyklonovací místo

štěpná místa pro restrikční endonukleázy

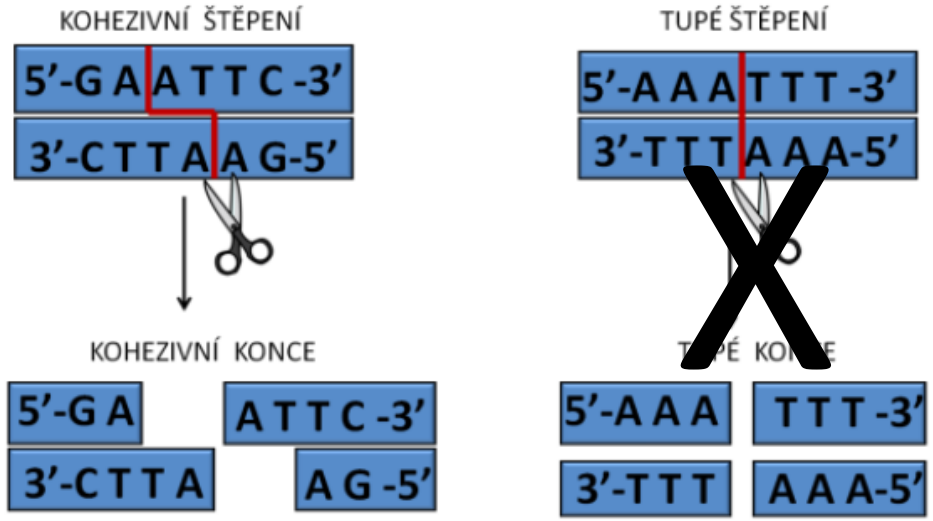
→ umožní **směrově** specifické klonování



Klonování

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

Restrikční endonukleázy:

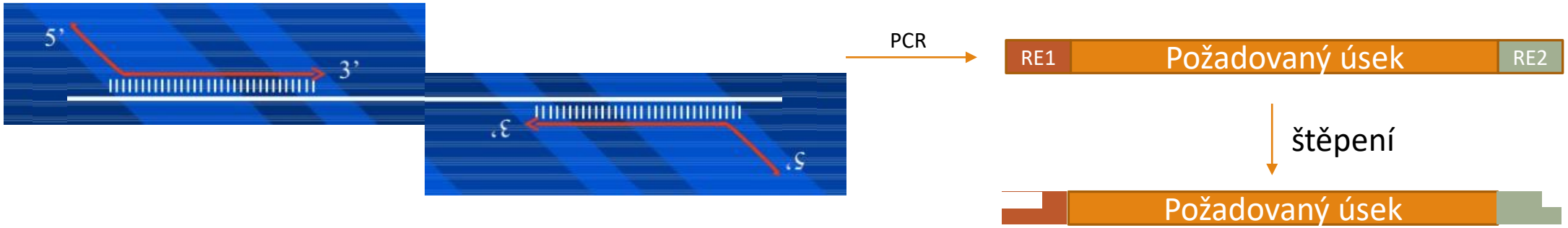


→ neumožní **směrově** specifické klonování

→ **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

Klonování - Specifické

→ **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování



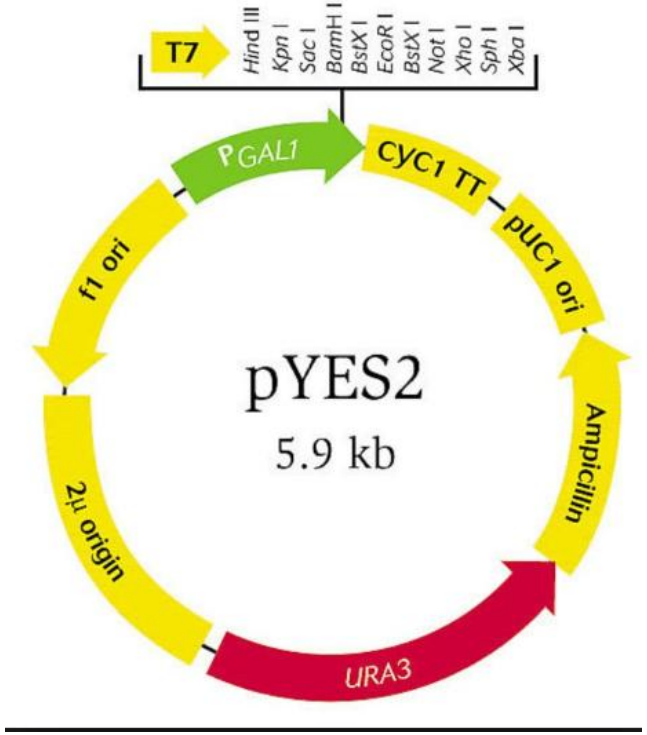
→ kontrola možného štěpení insertu/**restrikční analýza !**

UŽ umíme!

Klonování – Specifické: NQO1(CDS) → pYES2

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza !

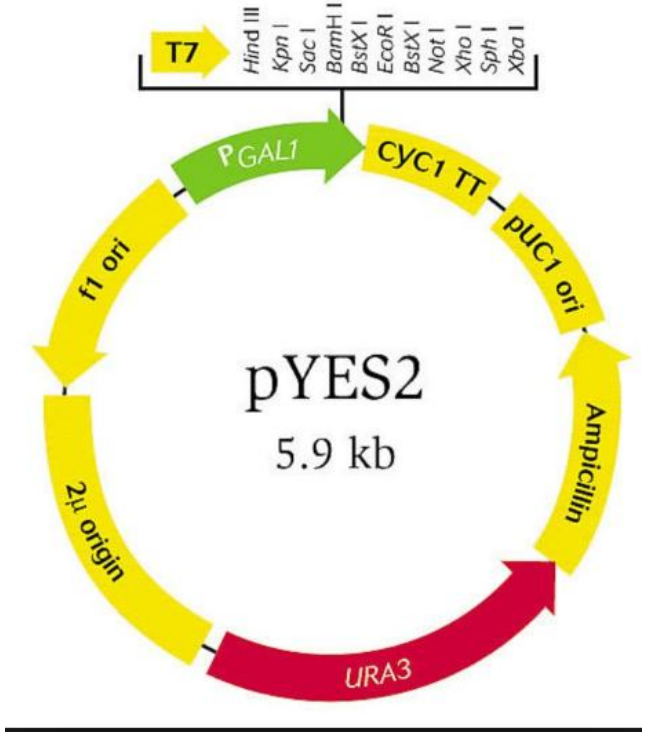


Př:Plasmid pYES pro expresi proteinů v kvasinkách *S. cerevisiae*/Galaktózový promotor (PGal1)

Klonování – Specifické: NQO1(CDS) → pYES2

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza !



1) Restriction summary:

HindIII a|agctt	none
SacI gagct|c	none
EcoRI g|aattc	603
XhoI c|tcgag	none

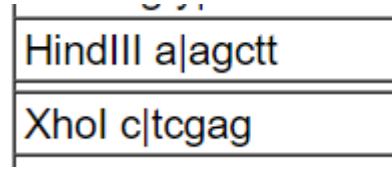
X

Př:Plasmid pYES pro expresi proteinů v kvasinkách *S. cerevisiae*/Galaktózový promotor (PGal1)

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE



→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

3´- ATCATGATTCTAAATA-5´

5´-TACTAGCTTTTAGGT-3´

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

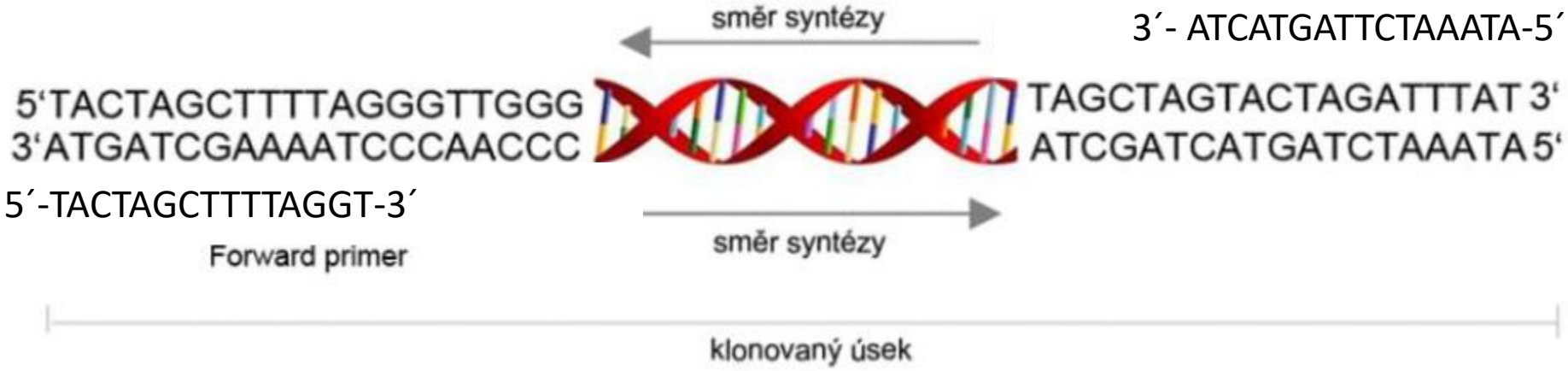
HindIII a|agctt

XhoI c|tcgag

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward: 5´-TACTAGCTTTTAGGT-3´ 15nt Tm=37,8°C

Reverse: 5´-ATAAATCTTAGTACTA-3´ 16nt Tm=35,4°C



Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

HindIII a|agctt

XhoI c|tcgag

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward: 5´-TACTAGCTTTTAGGT-3´ 15nt Tm=37,8°C

Reverse: 5´-ATAAATCTTAGTACTA-3´ 16nt Tm=35,4°C

→ doplnit rozpoznávající sekvenci (většinou 6nt) pro vybraný enzym

Forward: 5´- **AAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´ 21nt Tm=53,4,8°C

Reverse: 5´- **CTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´ 22nt Tm=54,7°C

XhoI

3´- ATCATGATTCTAAATA **GAGCTC-5´**

5'TACTAGCTTTTAGGGTTGGG TAGCTAGTACTAGATTTAT 3'

3'ATGATCGAAAATCCCAACCC ATCGATCATGATCTAAATA 5'

HindIII

5´-AAGCTT TACTAGCTTTTAGGT-3´

klonovaný úsek

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward:	5´- **AAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	21nt	Tm=53,4,8°C
Reverse:	5´- **CTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	22nt	Tm=54,7°C

→ doplnit rozpoznávající sekvenci (většinou 6nt) pro vybraný enzym

→ přidat cca 3-5nt „navíc“

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt	Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAACTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt	Tm=57,6°C

XhoI **GAGCTCAAT-5´**

3´- ATCATGATTCTAAATA

5'TACTAGCTTTTAGGGTTGGG TAGCTAGTACTAGATTTAT 3'
3'ATGATCGAAAATCCCAACCC ATCGATCATGATCTAAATA 5'

HindIII

5´-ACCAAGCTT TACTAGCTTTTAGGT-3´

klonovaný úsek

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt	Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAACTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt	Tm=57,6°C

→ doplnit rozpoznávající sekvenci (většinou 6nt) pro vybraný enzym

→ přidat cca 3-5nt „navíc“a vyladit Tm obou primerů

→ **zkontrolovat**

XhoI

3´- ATCATGATTCTAAA **GAGCTCAAT-5´**

5'TACTAGCTTTTAGGGTTGGG
3'ATGATCGAAAATCCCAACCC

TAGCTAGTACTAGATTTAT 3'
ATCGATCATGATCTAAATA 5'

HindIII

5´-ACCAAGCTT -TACTAGCTTTTAGGT-3´

klonovaný úsek

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt	Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAACTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt	Tm=57,6°C

→ doplnit rozpoznávající sekvenci (většinou 6nt) pro vybraný enzym

→ přidat cca 3-5nt „navíc“a vyladit Tm obou primerů

Možnost zvýšit teplotu záměnou **A** v **G**

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt	Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAGCTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt	Tm=59,2°C

→ **zkontrolovat**

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAGCTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt Tm=59,2°C

→ doplnit rozpoznávající sekvenci (většinou 6nt) pro vybraný enzym

→ přidat cca 3-5nt „navíc“a vyladit Tm obou primerů

→ **zkontrolovat**

XhoI

3´- ATCATGATTCTAAA **GAGCTCGAT-5´**

5'TACTAGCTTTTAGGGTTGGG
3'ATGATCGAAAATCCCAACCC

TAGCTAGTACTAGATTTAT 3'
ATCGATCATGATCTAAATA 5'

HindIII

5´-ACCAAGCTT -TACTAGCTTTTAGGT-3´

klonovaný úsek

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAGCTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt Tm=59,2°C

F:

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

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

Nucleotide base codes

ACC AAG CTT TAC TAG CTT TTA GGT

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

ACC TAA AAG CTA GTA AAG CTT GGT

5' modification (if any) | 3' modification (if any) | Select molecule: ssDNA

50 nM Primer
50 mM Salt (Na^+)
1 Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate | Swap Strands | BLAST | mfold

Physical Constants

Length: 24 Molecular Weight: 7317.8 [4] GC content: 38 %

1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm is 3.999 microMolar [5] and contains 29.3 micrograms.

Melting Temperature (T_M) Calculations

[1] 52.3 °C (Basic)
[2] 60.3 °C (Salt Adjusted)
[3] 54.12 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK 33.404 cal/(°K*mol) | deltaH 186.6 Kcal/mol
deltaG 28.9 Kcal/mol | deltaS 492.1 cal/(°K*mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

5 (Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)
4 (Minimum base pairs required for a hairpin)

Check Self-Complementarity

Potential hairpin formation :

```
5' ACCAAGCTTTACTAGCTTTTAGGT 3'
```

S tímto se nedá nic dělat
=primery ok

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

```
5'              ACCAAGCTTTACTAGCTTTTAGGT 3'
3' TGGATTTTCGATCATTTCGAACCA               5'

5'     ACCAAGCTTTACTAGCTTTTAGGT          3'
3' TGGATTTTCGATCATTTCGAACCA               5'

5'     ACCAAGCTTTACTAGCTTTTAGGT          3'
3' TGGATTTTCGATCATTTCGAACCA               5'
```

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAGCTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt Tm=59,2°C

R:

Oligonucleotide Properties Calculator

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

Nucleotide base codes

```
TAG CTC GAG ATA AAT CTT AGT ACT A
```

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

```
TAG TAC TAA GAT TTA TCT CGA GCT A
```

5' modification (if any) | 3' modification (if any) | select ss/ds and DNA or RNA: ssDNA

5 (Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)

4 (Minimum base pairs required for a hairpin)

50 nM Primer

50 mM Salt (Na^+)

Calculate | Swap Strands | BLAST | Check Self-Complementarity

Physical Constants

Length: 25 bases
GC content: 32 %
Molecular Weight: 7664.1 [4]
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm
is 3.568 microMolar [5] and contains 27.3 micrograms.

Melting Temperature (T_M) Calculations

[1] 51 °C (Basic)
[2] 59 °C (Salt Adjusted)
[3] 53 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants
Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK 33.404 cal/(°K*mol)
deltaG 28 Kcal/mol
deltaH 184.1 Kcal/mol
deltaS 486.9 cal/(°K*mol)

Oligo Self Complementarity Check

about:blank

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

OK

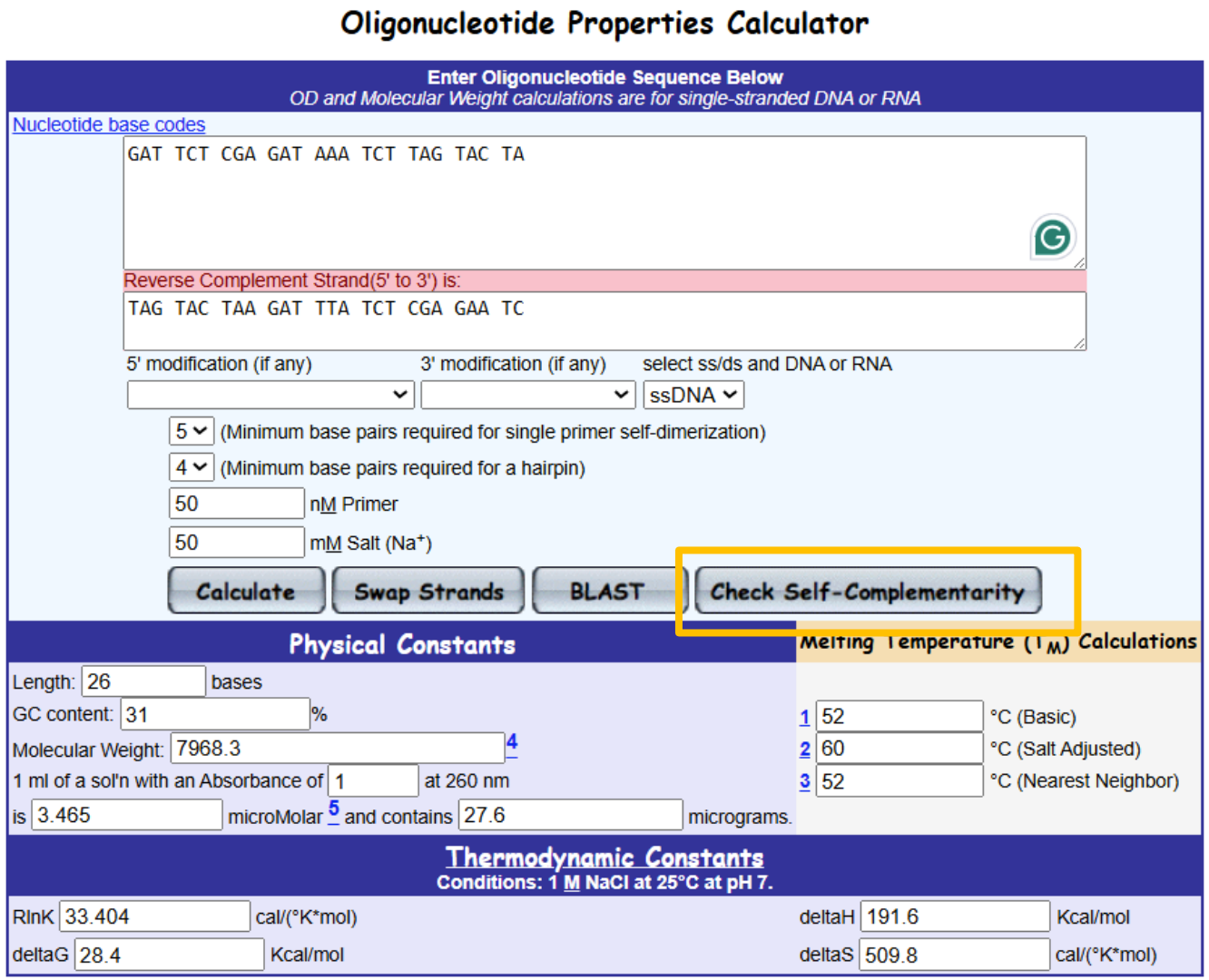
3' Complementarity:
None !

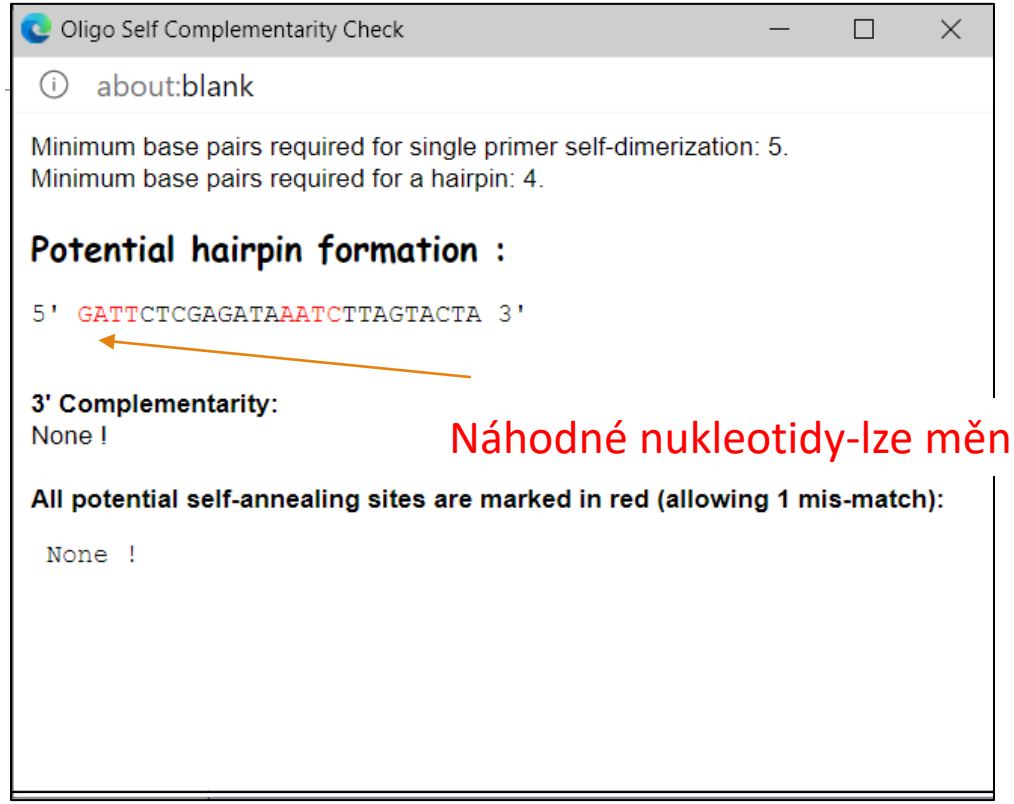
All potential self-annealing sites are marked in red (allowing

None !

Jiný příklad (kdyby R primer vypadal takto):

R:





Náhodné nukleotidy-lze měnit

Klonování - Specifické

- **primery** s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

→ doplnit rozpoznávající sekvenci (většinou 6nt) pro vybraný enzym

→ přidat cca 3-5nt „navíc“a vyladit Tm obou primerů

→ zkontrolovat

XhoI

3´- ATCATGATTCTAAATA-**GAGCTCGAT-5´**

5'TACTAGCTTTTAGGGTTGGG
3'ATGATCGAAAATCCCAACCC

TAGCTAGTACTAGATTTAT 3'
ATCGATCATGATCTAAATA 5'

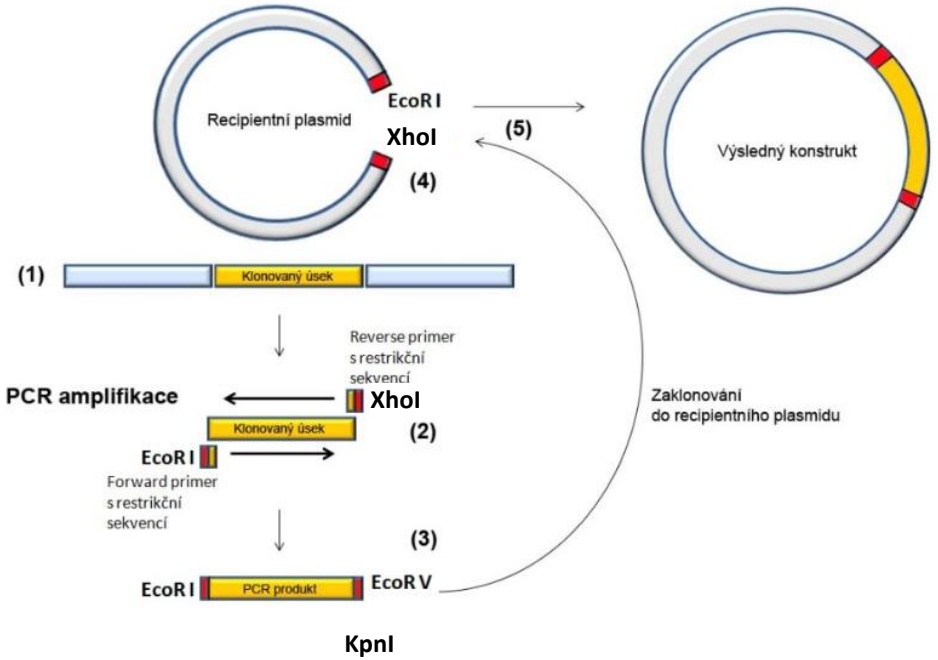
HindIII

5´-ACCAAGCTT-TACTAGCTTTTAGGT-3´

Forward:	5´- **ACCAAGCTT**TACTAGCTTTTAGGT-3´	25nt	Tm=60,3°C
Reverse:	5´- **TAGCTCGAG**ATAAATCTTAGTACTA-3´	26nt	Tm=59,2°C

Klonování-Specifické

Labguide.cz



Obr. Při PCR klonování navrhneme ke koncům klonovaného úseku (1) primery s požadovanými restrikčními místy (2). Po PCR amplifikaci nese klonovaný úsek na svých koncích daná restrikční místa (3). Cílový vektor (4) je rozštěpen restrikčním enzymem tak, že konce jsou kompatibilní s konci klonovaného úseku. Klonovaný úsek je zaligován do vektoru pomocí daných restrikčních míst (5).

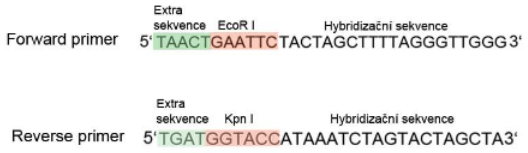
Primery pro PCR klonování

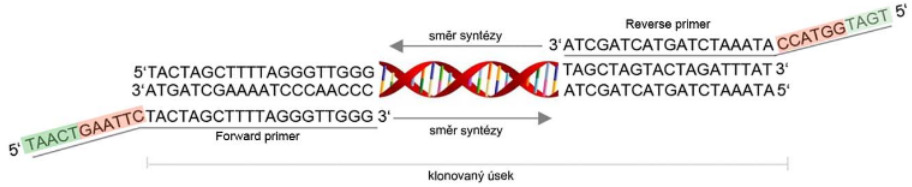
Primery pro PCR klonování jsou ve směru 5'-3' složeny z extra sekvence, restrikční sekvence a hybridizační sekvence:

Extra sekvence – pokud rozpoznávací sekvence restrikčních enzymů leží přímo na konci molekuly DNA, často se stane, že enzym takovou sekvenci neštěpí dostatečně účinně. Proto se při navrhování primeru doporučuje na 5' konec primeru přidat ještě dodatečnou, krátkou sekvenci (obvykle 3-6 bp). Složení sekvence je v podstatě libovolné, krom samozřejmě toho, že tato sekvence nesmí se sekvencí primeru formovat vlásenkovou strukturu.

Restrikční sekvence – vhodná sekvence pro restrikční štěpení

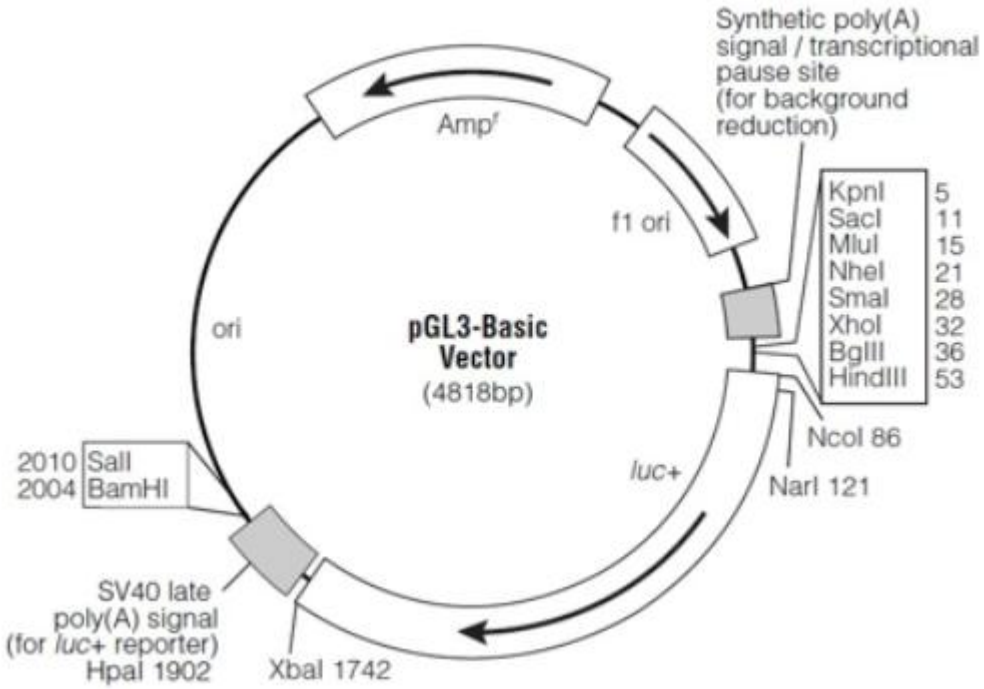
Hybridizační sekvence – sekvence primeru, která se váže k amplifikovanému úseku (obvykle 18-21 bp)





Klonování – doporučení:

Návrh primerů obsahujících restrikční místa:

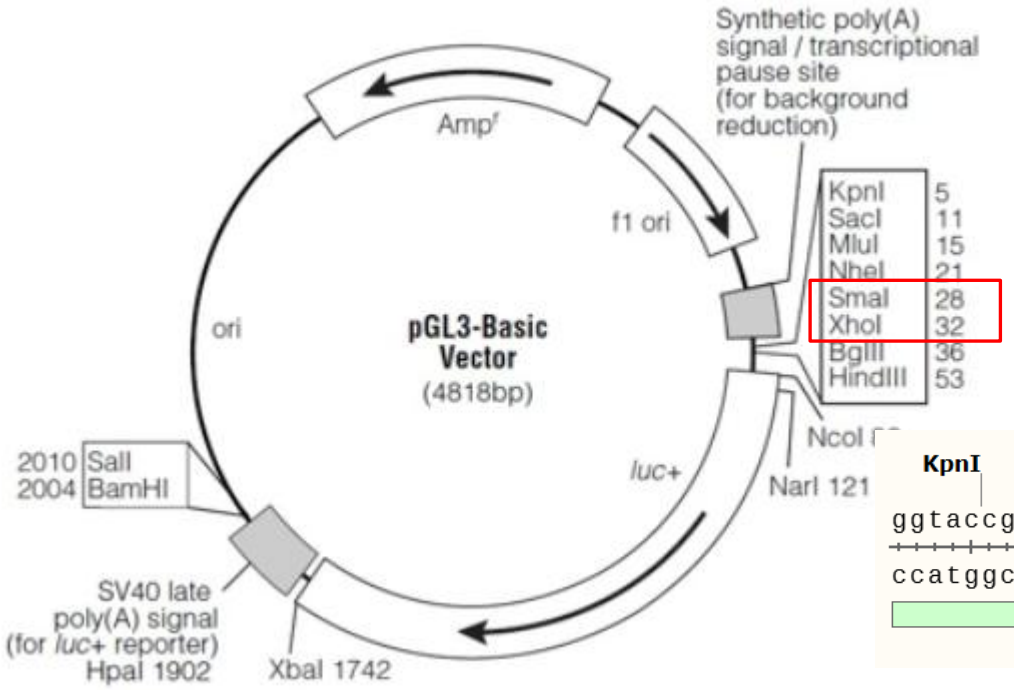


Start - ATG

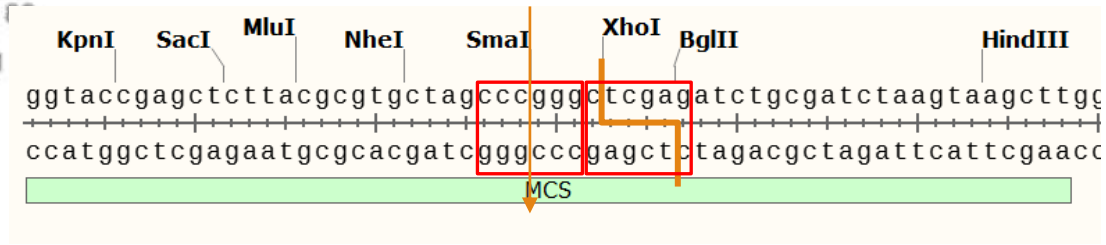
STOP (nebo ne – podle typu experimentu)

Klonování – doporučení:

Návrh primerů obsahujících restrikční místa:



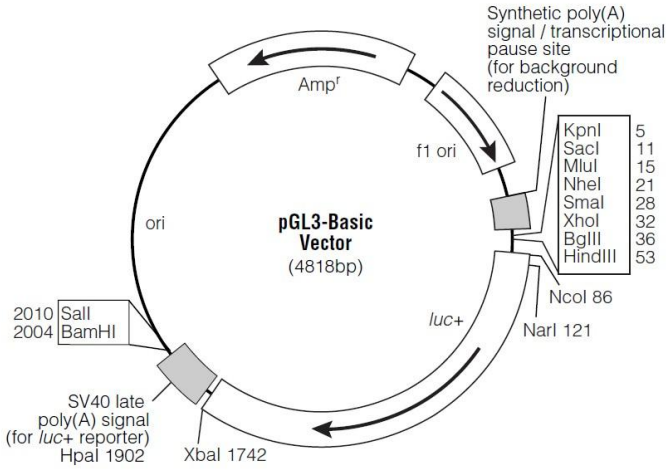
nevhodné vybírat RE vedle sebe

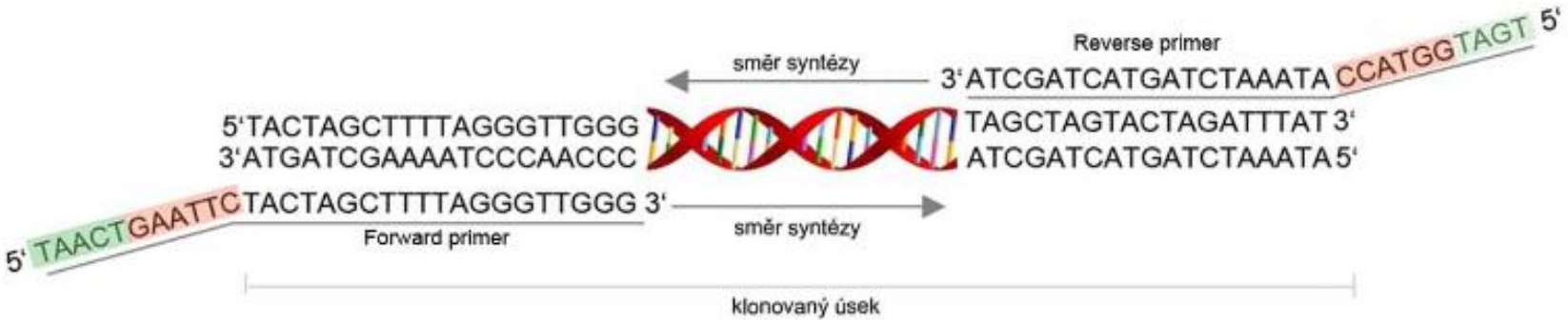


Vyzkoušejte si….DU8-2.část

….navrhnout primery pro amplifikaci „vašeho“ genu pro zaklonování do plasmidu pGL3

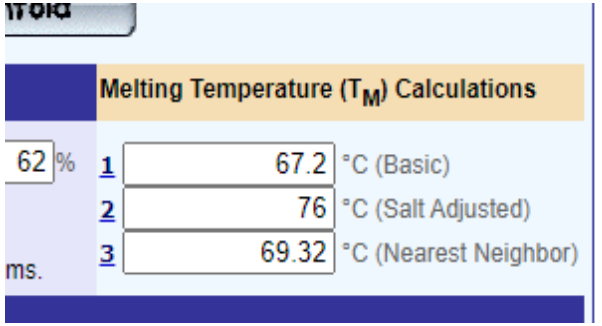
→zkontrolujte sekvenci, které RE budou vhodné (tj. cílová sekvence neobsahuje příslušná štěpná místa)
→vložte příslušné sekvence do primerů pro PCR
→“vyladťe“ Tm obou primerů, aby se příliš nelišily (odebírání, přidávání (náhodných) nukleotidů a kontrola v OligoCalc)





DU8-2.část-ukázka řešení F primeru:

celá sekvence: (variabilní nukleotidy-zvolený RE-forward primer) : ACG ACG CGT ATG CCC CGC ATA GAT GCG GA



-> příliš vysoká teplota, uberu nukleotidy na konci (musí zůstat aspoň 10nt, lépe 12nt)

-> nebo pozměním náhodné nukleotidy na začátku

výsledný primer: ACG ACG CGT ATG CCC CGC AT (T_M=64.6°C)

ATT ACG CGT ATG CCC CGC ATA GA (T_M=64.6°C)

DU8

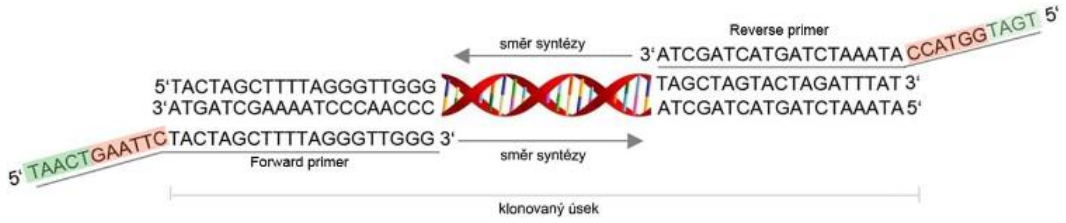
1) Zjistěte zda a kolikrát štěpí **CDS** sekvenci vašeho genu enzymy: XhoI, HindIII, SacI

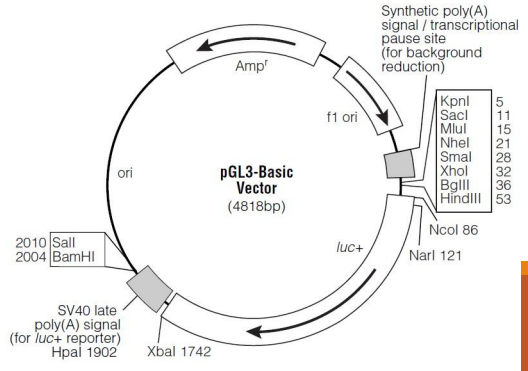
2) Jaké fragmenty z vaší **CDS** vzniknou po štěpení všemi těmito enzymy?

3) Vyberte RE, kterou byste štěpili vaši CDS jednou a výsledek na gelu by vhodně potvrdil vznik předpokládaného produktu

4) Navrhněte primery pro amplifikaci „vašeho“ genu pro zaklonování do plasmidu pGL3

→zkontrolujte sekvenci, které RE budou vhodné (tj. cílová sekvence neobsahuje příslušná štěpná místa)
→vložte příslušné sekvence do primerů pro PCR
→“vylaďte“ Tm obou primerů, aby se příliš nelišily (odebírání, přidávání (náhodných) nukleotidů a kontrola v OligoCalc)





DÚ8 – Návrh primerů - řešení

1-2) Celá sekvence NQO1 by byla štěpena pouze BamHI, který by byl nevhodný pro klonování

XhoI c|tcgag	none
SacI gagct|c	none
HindIII a|agctt	none

3) vzniknou dva fragmenty (479+346):

BamHI g|gatcc	480

Restriction Digest results

```
>479 bp linear fragment from linear parent Untitled, base 1 to base 479 (se
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTAT
GCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCG
GACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTG
AAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCAT
CTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTC
CAGTTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTG
TTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGG

>346 bp linear fragment from linear parent Untitled, base 480 to base 825 (
GATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTG
TGGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGC
CCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACC
ACTGTATTTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAGGATTCTTAATGAA
AAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGGCCATCACTT
GGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```