

# Základy praktické Bioinformatiky

---

PETRA MATOUŠKOVÁ

2023/2024

8/10

## Nukleotidová bioinformatika IV

### Cíle:

Student bude schopen navrhnout primery pro amplifikaci DNA s vloženými restrikčními místy pro následné klonování.

..a primery pro detekci konkrétního genu, kvantitativní stanovení vybraného genu (qPCR) a zkontrolovat zda primery uvedené v publikacích jsou v dostatečné kvalitě.

# ad DU7

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

## 3. exon:

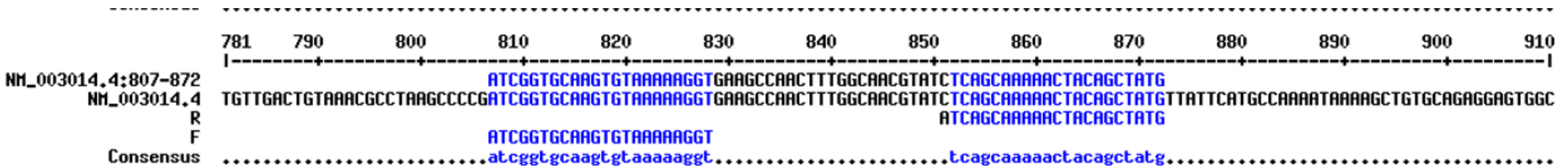
>NM\_003014.4:807-872 Homo sapiens secreted frizzled related protein 4 (SFRP4), mRNA

ATCGGTGCAAGTGTA AAAAGGTGAAGCCAAC TTTGGCAACGTATCTCAGCAAAA ACTACAGCTATG

- navrhnete F a R primer tak aby im nebyla vetsi nez 60 C

Forward primer: ATC GGT GCA AGT GTA AAA AGG T

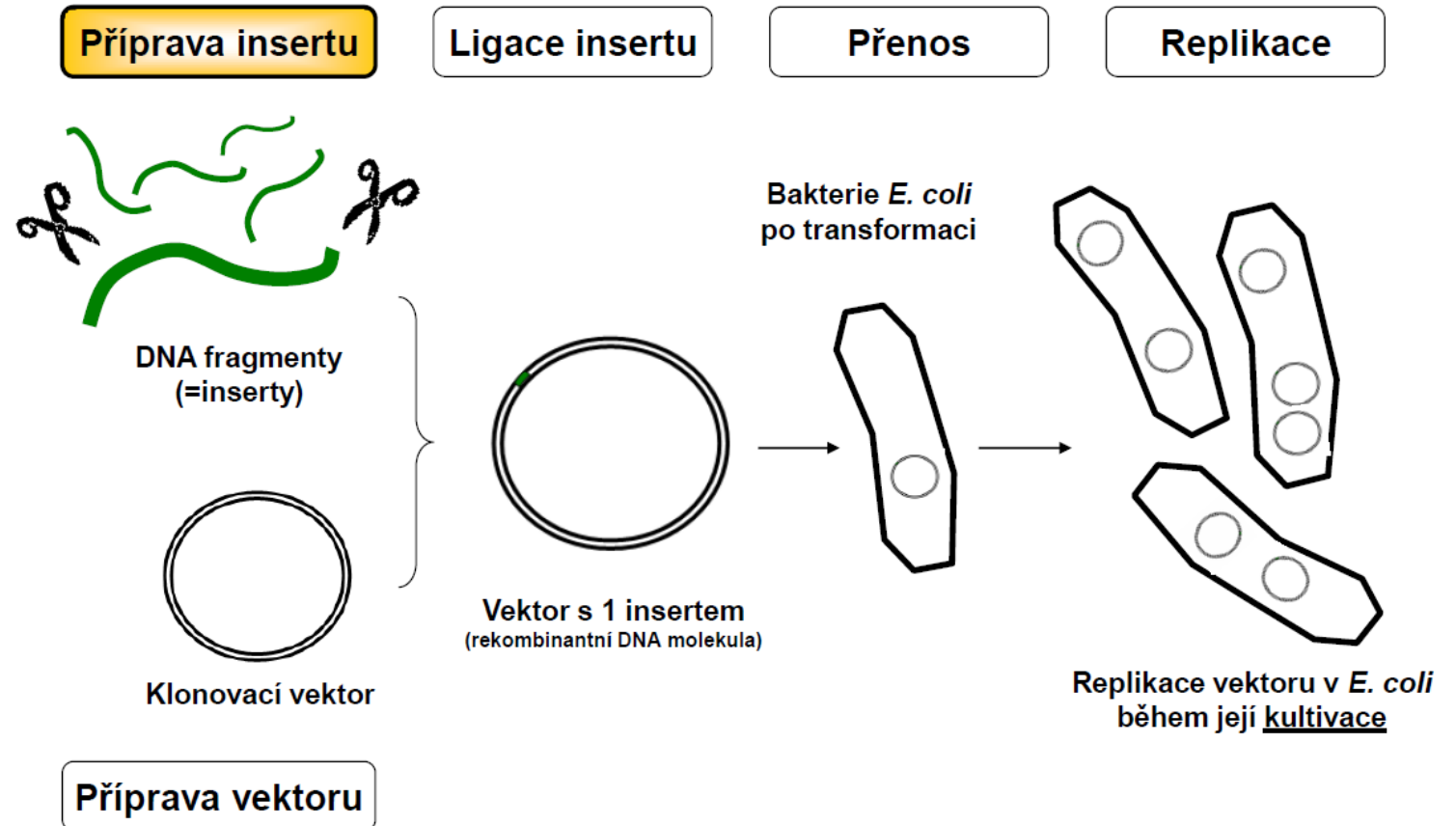
Reverse primer: ATC AGC AAA AAC TAC AGC TAT G



# Klonování

=namnožení úseku DNA

## Proces klonování DNA



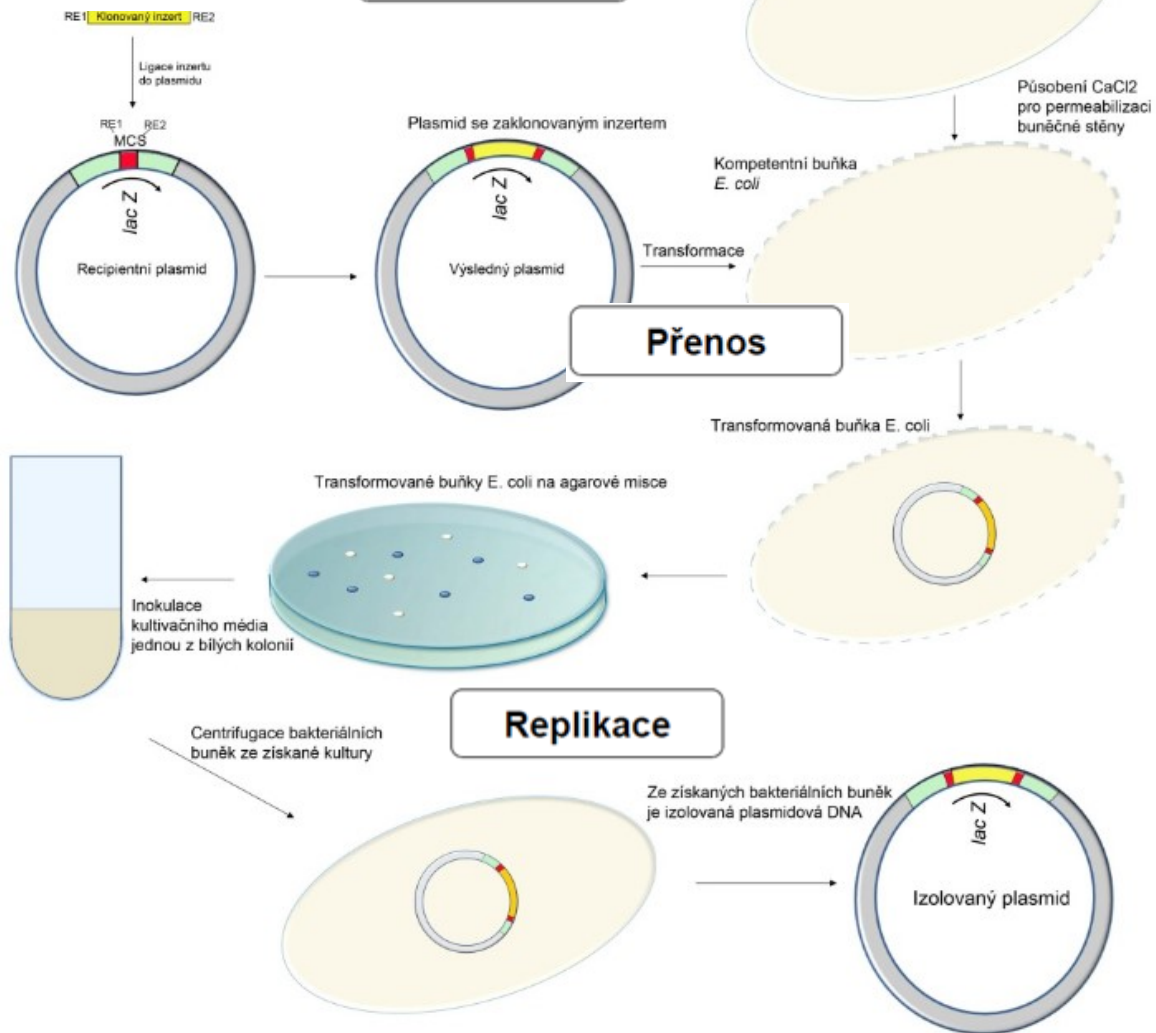
(Prof. Beránek Molekulární Biologie)

# Klonování

## SCHÉMA PROCESU KLONOVÁNÍ

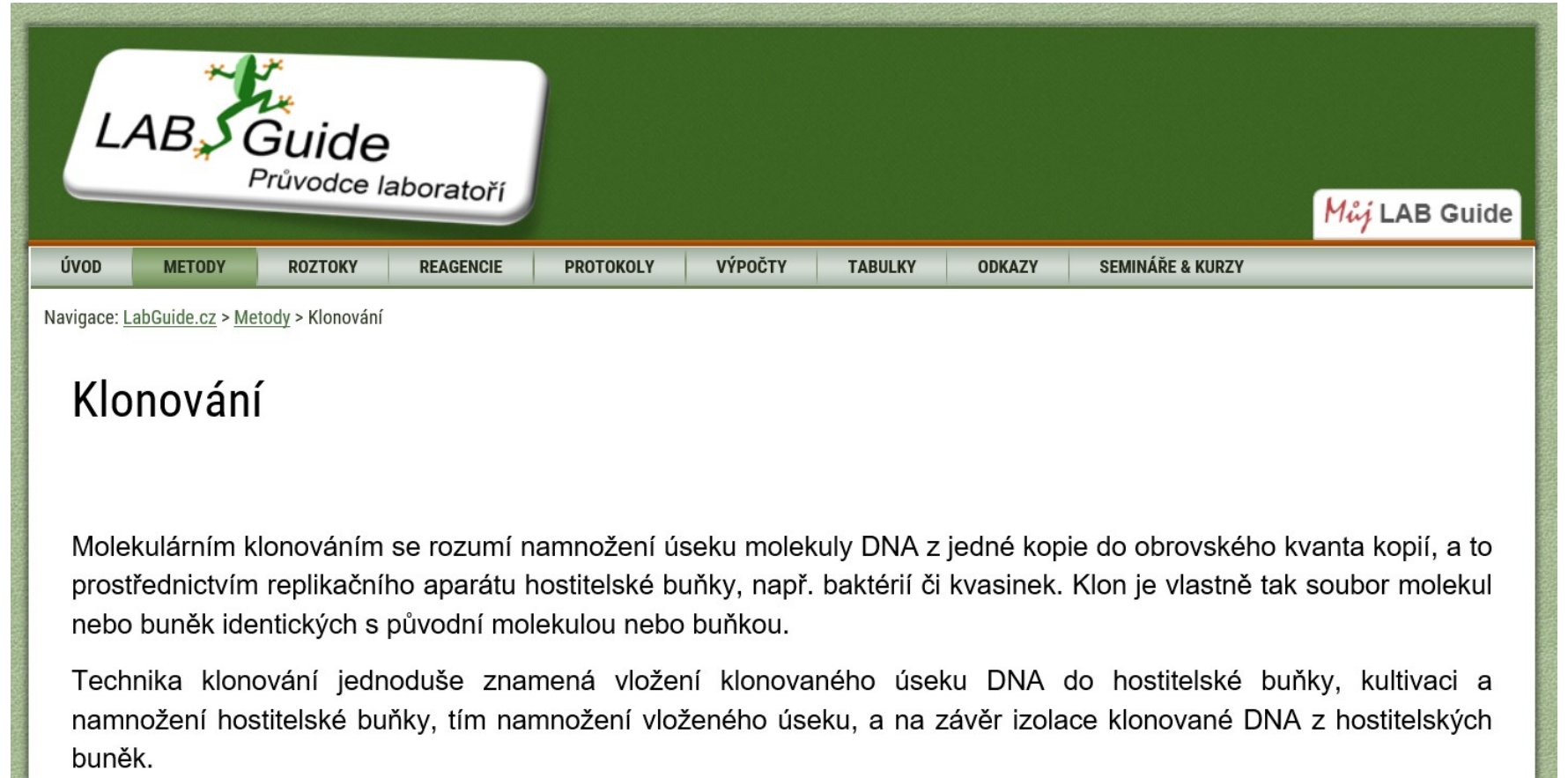
### Příprava insertu

### Ligace insertu



# Klonování

Labguide.cz



The screenshot shows the LabGuide website interface. At the top left is the logo 'LAB Guide Průvodce laboratoří' featuring a green frog. At the top right is a button labeled 'Můj LAB Guide'. Below these is a navigation menu with tabs: ÚVOD, METODY, ROZTOKY, REAGENCIE, PROTOKOLY, VÝPOČTY, TABULKY, ODKAZY, and SEMINÁŘE & KURZY. The 'METODY' tab is selected. Below the menu, the breadcrumb path reads 'Navigace: LabGuide.cz > Metody > Klonování'. The main heading is 'Klonování'. The text describes molecular cloning as the amplification of a DNA fragment from one copy to a large number of copies using a host cell's replication machinery, such as bacteria or yeast. It also notes that cloning is essentially a set of molecules or cells identical to the original molecule or cell. The technique is described as simple, involving the insertion of a cloned DNA fragment into a host cell, cultivation, and isolation of the cloned DNA from the host cells.

**LAB Guide**  
Průvodce laboratoří

Můj LAB Guide

ÚVOD METODY ROZTOKY REAGENCIE PROTOKOLY VÝPOČTY TABULKY ODKAZY SEMINÁŘE & KURZY

Navigace: [LabGuide.cz](#) > [Metody](#) > Klonování

## Klonování

Molekulárním klonováním se rozumí namnožení úseku molekuly DNA z jedné kopie do obrovského kvanta kopií, a to prostřednictvím replikačního aparátu hostitelské buňky, např. bakterií či kvasinek. Klon je vlastně tak soubor molekul nebo buněk identických s původní molekulou nebo buňkou.

Technika klonování jednoduše znamená vložení klonovaného úseku DNA do hostitelské buňky, kultivaci a namnožení hostitelské buňky, tím namnožení vloženého úseku, a na závěr izolace klonované DNA z hostitelských buněk.

# 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 rámeček

Mutageneze

# Klonování

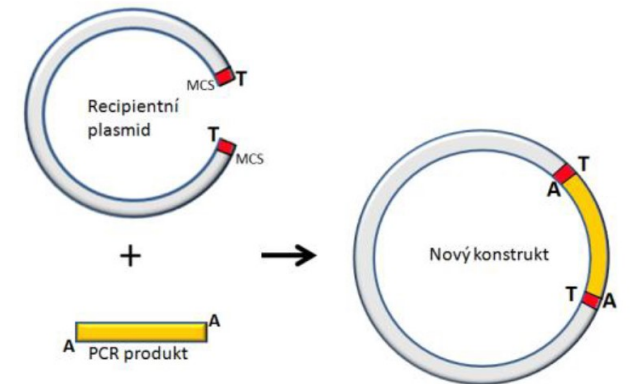
Ne-specifické klonování pro namnožení úseku DNA (např. pro **sekvenování určitého úseku**, celé CDS...)

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými konci (případně TA klonování / *Taq* polymeráza)

Forward -horní primer

Reverse -dolní primer

```
>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1  
(NQO1), transcript variant 1, mRNA  
ATGGTCGGCAGAAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG  
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT  
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACCTTTCAGTATCCTGCC  
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG  
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCTCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTTCTGAAAGGCTGGTT  
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGGTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCGGGAGT  
AAGAAGGCAGTGCTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG  
ACATGAATGTCAATCTCTGGCCAAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC  
TCAACTGACATATAGCATTTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA  
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACCACTGTATTTTGTCTCAAGCAGCCTCTTTGACCTAACTTCC  
AGGCAGGATTCCTAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG  
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```





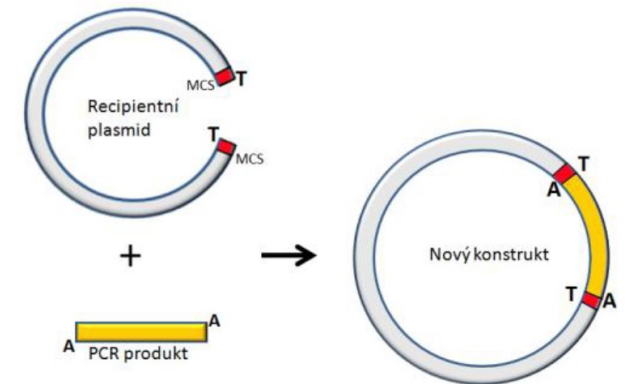
# Klonování

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

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými konci (případně TA klonování / *Taq* polymeráza)

**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  
ATGGTCGGCAGAAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG  
AGGCTGCTGCAGCGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT  
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC  
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG  
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCTCCCTGCAGTGGTGGAGTCCCTGCCATTTCTGAAAGGCTGGTT  
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTCCGGAGT  
AAGAAGGCAGTGCTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG  
ACATGAATGTCATTTCTGGCCAAATTCAGAGTGGCATTTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC  
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA  
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCACTGTATTTGTCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAACTTCC  
AGGCAGGATTCCTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG  
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```



# Klonování

---

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

- Klonování konkrétních úseků: „**manuální návrh**“
- Klonování s tupými konci (případně TA klonování / *Taq* polymeráza)

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
ATGGTCGGCAGAAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTCCTCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGGTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCGGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCCTGTATTTGTCTCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCCTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

→ primery je nutné „**vyladit**“ aby seděly  $T_m$  (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 konci (**případně TA klonování / Taq polymeráza**)

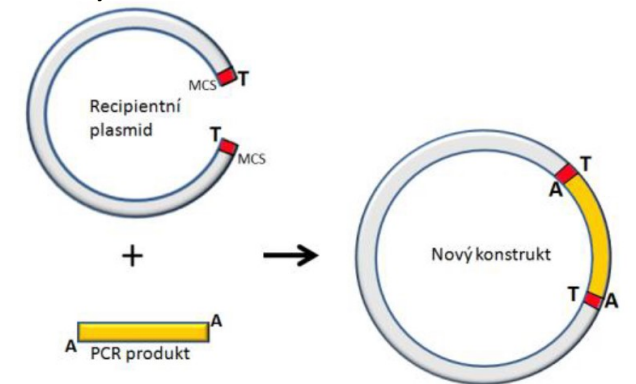
Forward -horní primer

**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
ATGGTCGGCAGAAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAGTGAAGGACCCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATTCAGTTCCTCCCTGCAGTGGTGGAGTCCCTGCCATTTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCGGGAGT
AAGAAGGCAGTGCTTCCATCACCACTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTTCTGGCCAAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC
TCAACTGACATATAGCATTTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACCACTGTATTTGTCTCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATTCCTAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```



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

# Klonování

---

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

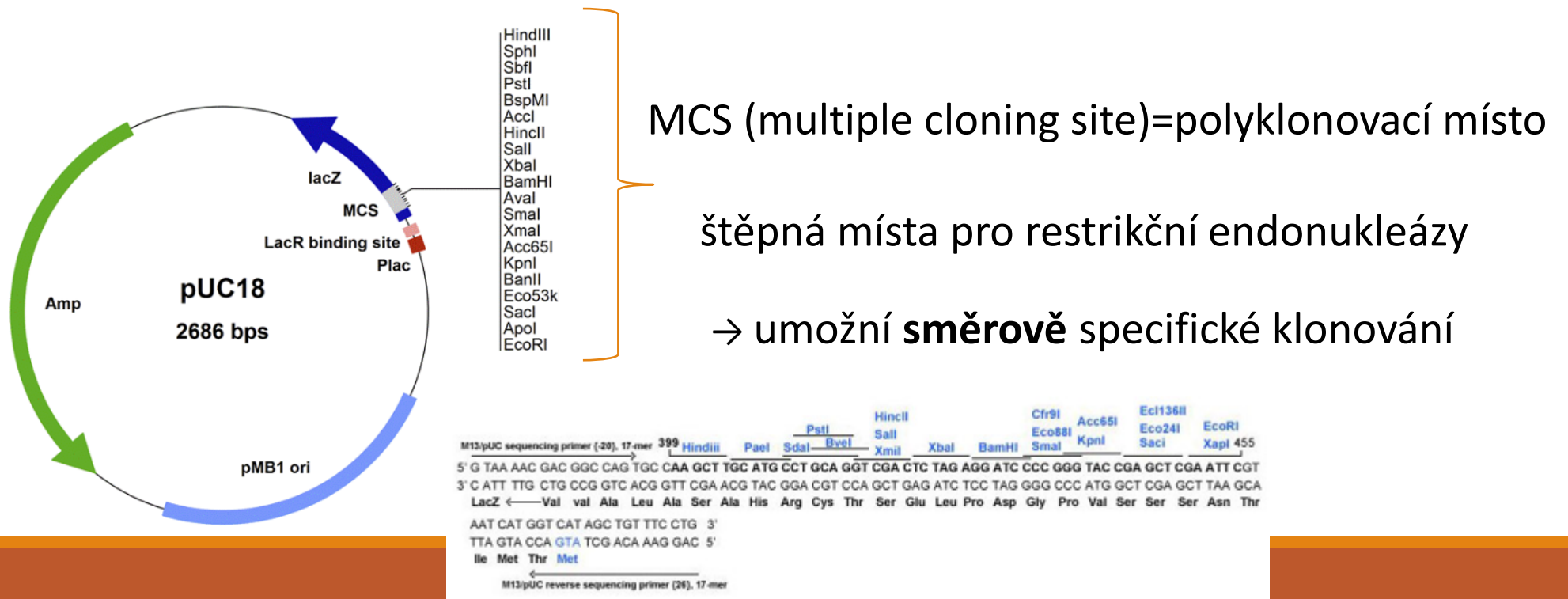
**Specifické (např. klonování celé CDS, analýza promotorové oblasti, 3'UTR...)**

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

Mutageneze

# Klonování

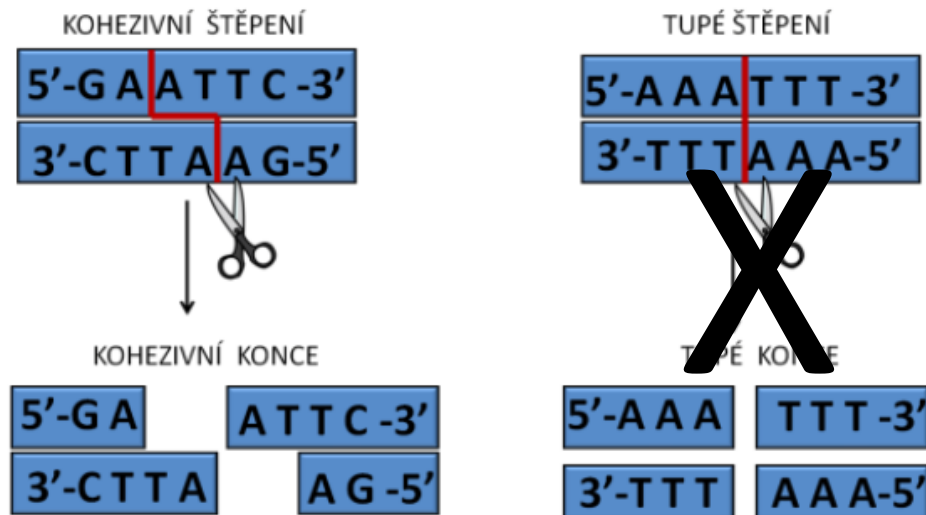
Specifické (např. klonování celé CDS, analýza promotorové oblasti, 3' UTR...)



# Klonování

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

Restrikční endonukleázy:

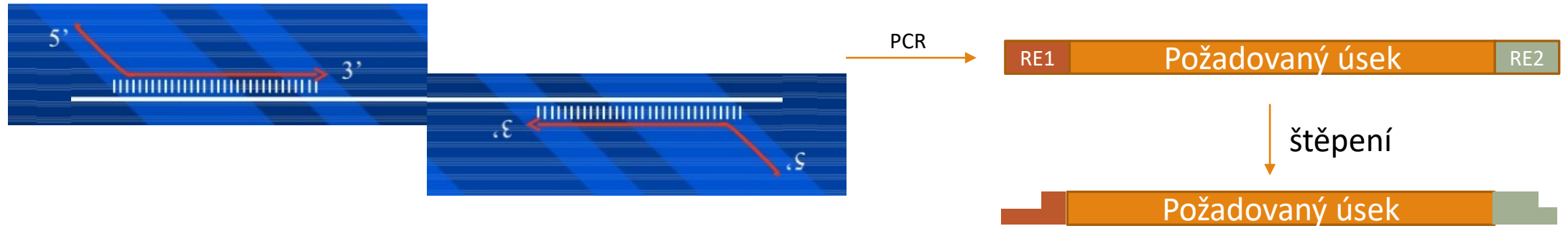


→ neumožní **směrově** specifické klonování

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

# Klonování - Specifické

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

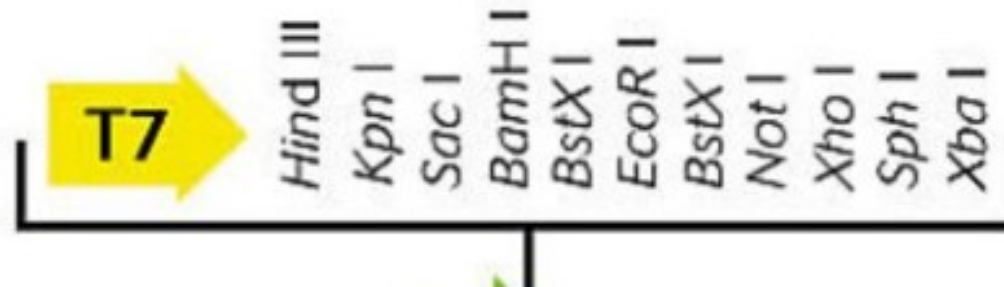
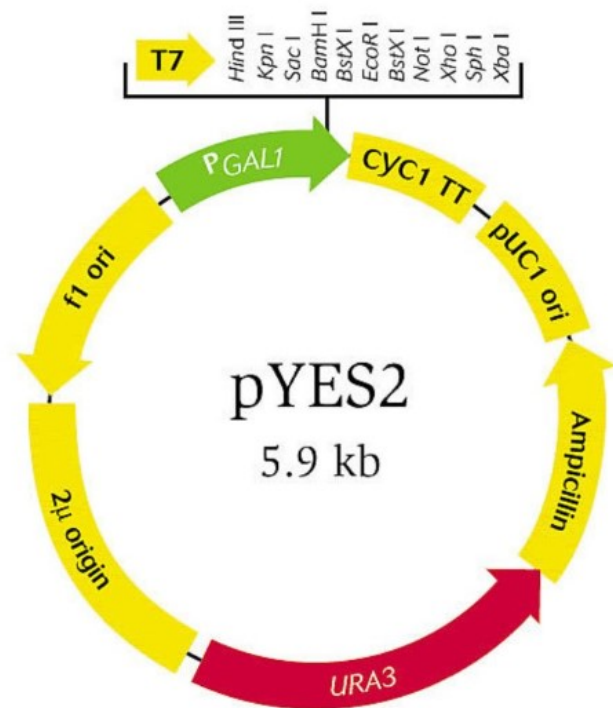


→ kontrola možného štěpení insertu/**restrikční analýza !**  
**UŽ umíme!**

# Klonování – Specifické: NQO1(CDS) → pYES2

➤ primery s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza !

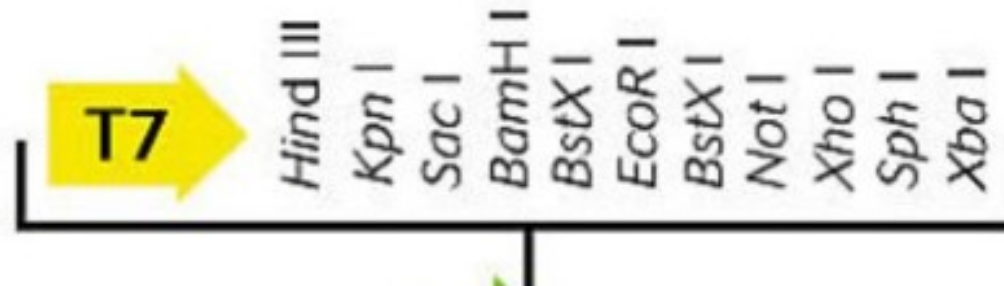
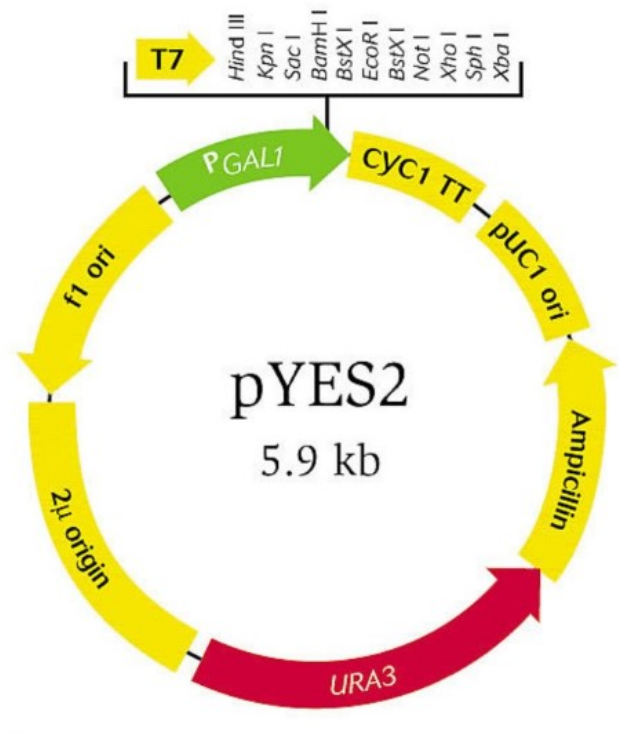




# Klonování – Specifické: NQO1(CDS) → pYES2

➤ primery s „vloženými“ štěpnými místy vybraných enzymů pro klonování

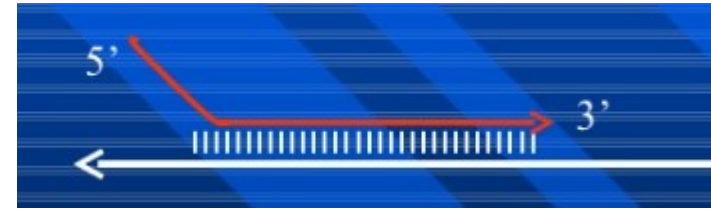
→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza !



1) Restriction summary:

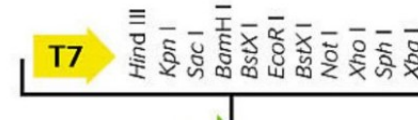
HindIII a agctt	none
SacI gagct c	none
EcoRI g aatc	603 X
XhoI c tcgag	none

# Klonování - Specifické



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

→ kontrola možného štěpení insertu/restrikční analýza: výběr RE



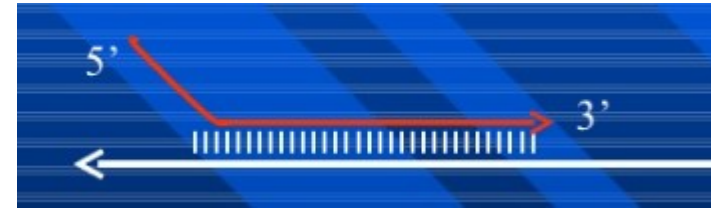
HindIII a agctt
XhoI c tcgag

→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně



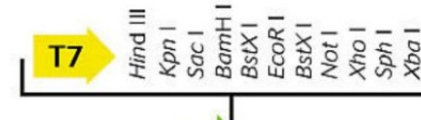
klonovaný úsek

# 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

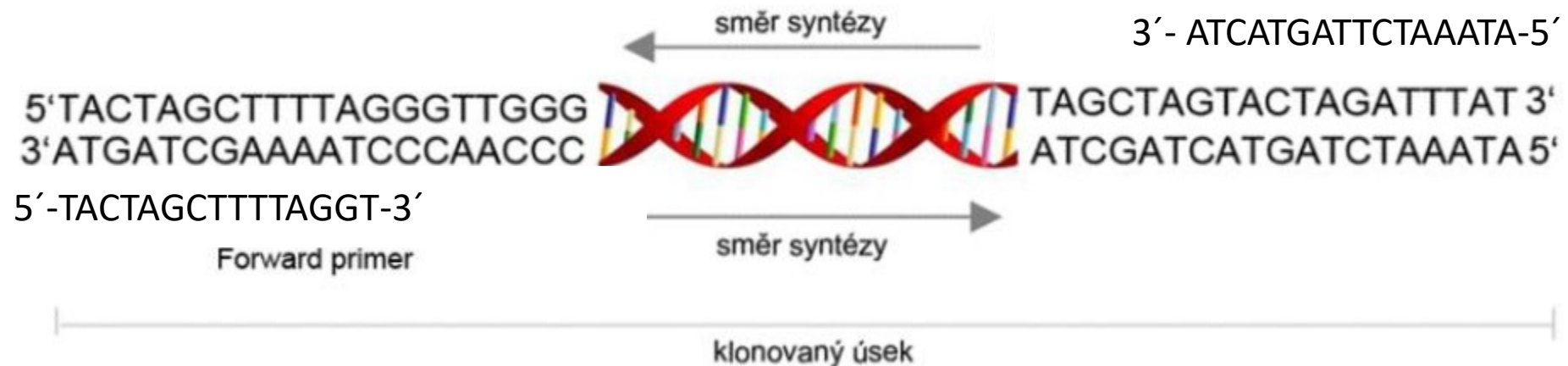
→ vytvořit kratší (cca 15nt) primery manuálně

Forward: 5'-TACTAGCTTTTAGGT-3'

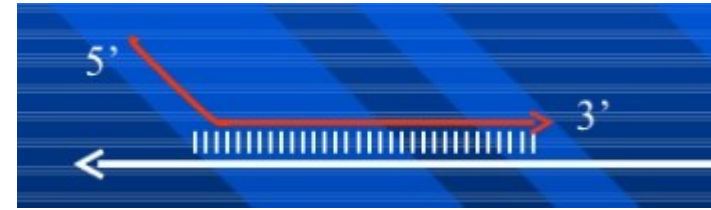
Reverse: 5'-ATAAATCTTAGTACTA-3'

15nt T<sub>m</sub>=37,8°C

16nt T<sub>m</sub>=35,4°C



# 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'-TACTAGCTTTTAGGT-3'

Reverse: 5'-ATAAATCTTAGTACTA-3'

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

HindIII	a agctt
XhoI	c tcgag
15nt	Tm=37,8°C
16nt	Tm=35,4°C

Forward: 5'- <b>AAGCTT</b> TACTAGCTTTTAGGT-3'	21nt Tm=53,4,8°C
Reverse: 5'- <b>CTCGAG</b> ATAAATCTTAGTACTA-3'	22nt Tm=54,7°C

3' - ATCATGATTCTAAATA

XhoI  
**GAGCTC-5'**

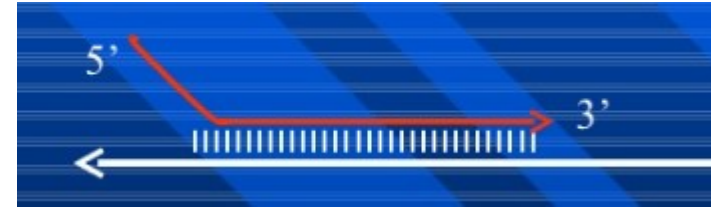


HindIII

**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'- <b>AAGCTT</b> TACTAGCTTTTAGGT-3'	21nt Tm=53,4,8°C
Reverse:	5'- <b>CTCGAG</b> ATAAATCTTAGTACTA-3'	22nt Tm=54,7°C

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

→ přidat cca 3-5nt „navíc“

Forward:	5'- <b>ACCAAGCTT</b> TACTAGCTTTTAGGT-3'	25nt Tm=60,3°C
Reverse:	5'- <b>TAAC</b> <b>TCGAG</b> ATAAATCTTAGTACTA-3'	26nt Tm=57,6°C

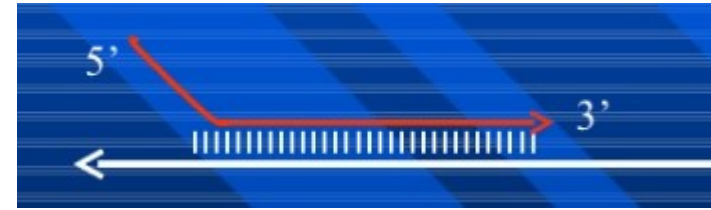
3'- ATCATGATTCTAAATA **XhoI**  
**GAGCTCAAT-5'**



HindIII  
**5'-ACCAAGCTT** TACTAGCTTTTAGGT-3'

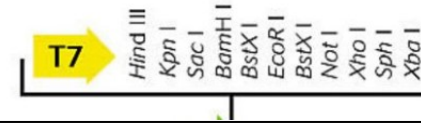
klonovaný úsek

# 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**

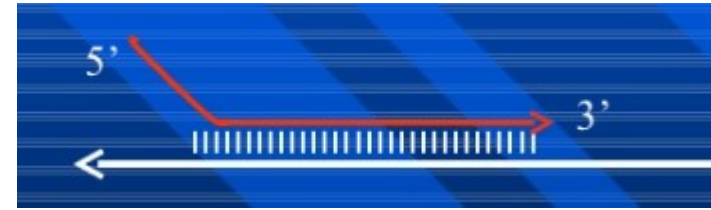
3' - ATCATGATTCTAAA **XhoI GAGCTCAAT-5'**



klonovaný úsek

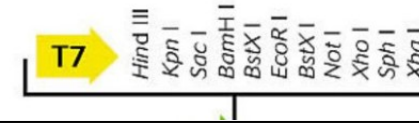


# Klonování - Specifické



➤ 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

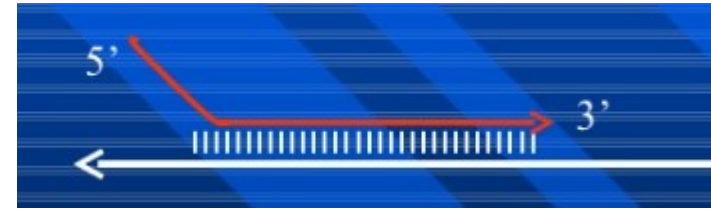
→ přidat cca 3-5nt „navíc“ a vyladit Tm obou primerů

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

→ **zkontrolovat**

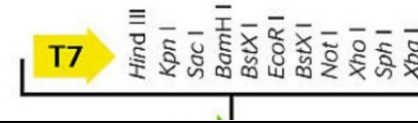
Forward:	5' - ACCAAGCTT TACTAGCTTTTAGGT -3'	25nt Tm=60,3°C
Reverse:	5' - TAGCTCGAG ATAAATCTTAGTACTA -3'	26nt Tm=59,2°C

# 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**

3' - ATCATGATTCTAAA **XhoI GAGCTCGAT-5'**



klonovaný úsek



## Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

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

F:

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<sup>+</sup>)  1 Measured Absorbance at 260 nanometers

**Physical Constants**

Length:  24 Molecular Weight:  7317.8<sup>4</sup> GC content:  38%  
 1 ml of a sol'n with an Absorbance of  1 at 260 nm  
 is  3.999 microMolar<sup>5</sup> and contains  29.3 micrograms.

**Melting Temperature (T<sub>M</sub>) 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)

### Potential hairpin formation :

5' ACCAAGCTTTACTAGCTTTTAGGT 3'

3' Complementarity:  
 None !

S tímto se nedá nic dělat  
 =primery ok

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'

# Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

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

R:

# Klonování - Specifické

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

Nucleotide base codes  
ATT CTC GAA ATA TAT CTT AGT ACG A

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:  
TAG TAC TAA GAT TTA TCT CGA GAA T

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
[ ] [ ] ssDNA

50 nM Primer  
50 mM Salt (Na<sup>+</sup>) [ ] Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate Swap Strands BLAST mfold

**Physical Constants** Melting Temperature (T<sub>M</sub>) Calculations

Length: 25 Molecular Weight: 7639.1 GC content: 28%  
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm  
is 3.615 microMolar and contains 27.6 micrograms.

1 49.5 °C (Basic)  
2 57.6 °C (Salt Adjusted)  
3 50.7 °C (Nearest Neighbor)

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

RlnK 33.404 cal/(°K\*mol) deltaH 182.8 Kcal/mol  
deltaG 26.9 Kcal/mol deltaS 486.3 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

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 !

**3' Complementarity:**

None !

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

None !

OK

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

## Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

R:

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

[Nucleotide base codes](#)

GTA TCT CGA GAT AAA TCT TAG TAC TA

**Jiný příklad**

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:  
 TAG TAC TAA GAT TTA TCT CGA GAT AC

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

50 nM Primer  
 50 mM Salt (Na<sup>+</sup>) 1 Measured Absorbance at 260 nanometers

**Calculate** **Swap Strands** **BLAST** **mfold**

**Physical Constants** **Melting Temperature (T<sub>M</sub>) Calculations**

Length: 26 Molecular Weight: 7968.3<sup>4</sup> GC content: 31%  
 1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm  
 is 3.465 microMolar<sup>5</sup> and contains 27.6 micrograms.

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

RlnK 33.404 cal/(°K\*mol) deltaH 190.8 Kcal/mol  
 deltaG 28.1 Kcal/mol deltaS 508.3 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**

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 :**

5' **GATT**TCTCGAGATAAAT**CT**TTAGTACTA 3'

←

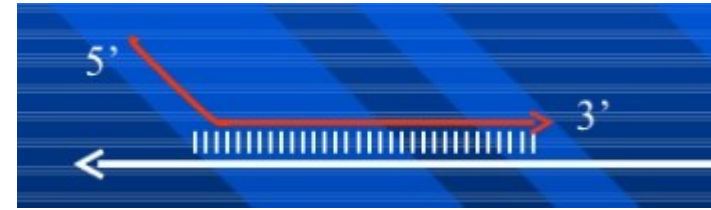
**3' Complementarity:**  
 None !

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

None !

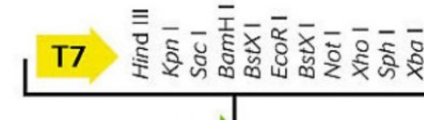
**Náhodné nukleotidy-lze měnit**

# 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

3' - ATCATGATTCTAAA **XhoI**  
**GAGCTCGAT-5'**

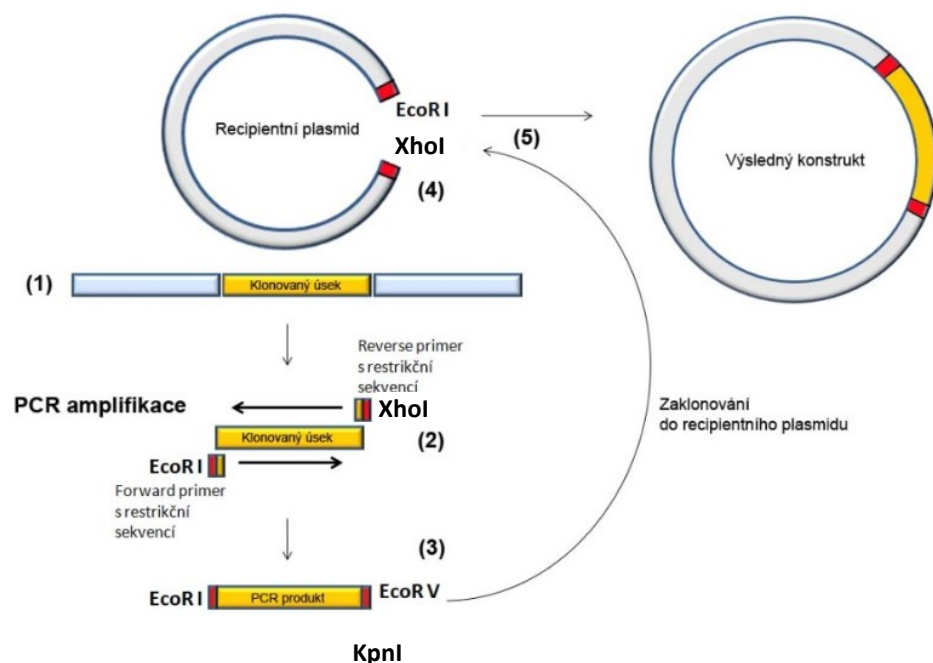


**HindIII**  
**5'-ACCAAGCTT** -TACTAGCTTTTAGGT-3'

Forward:	5' - <b>ACCAAGCTT</b> TACTAGCTTTTAGGT-3'	25nt Tm=60,3°C
Reverse:	5' - <b>TAGCTCGAG</b> AATAATCTTAGTACTA-3'	26nt Tm=59,2°C

# Klonování-Specifické

Labguide.cz



**Obr.** Při PCR klonování navrhne 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

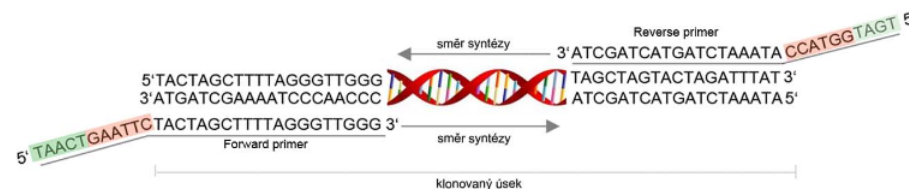
Primery pro PCR klonování jsou ve směru 5'-3' složeny z extra sekvence, restrikční sekvence a hybridizační sekvence:

**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)

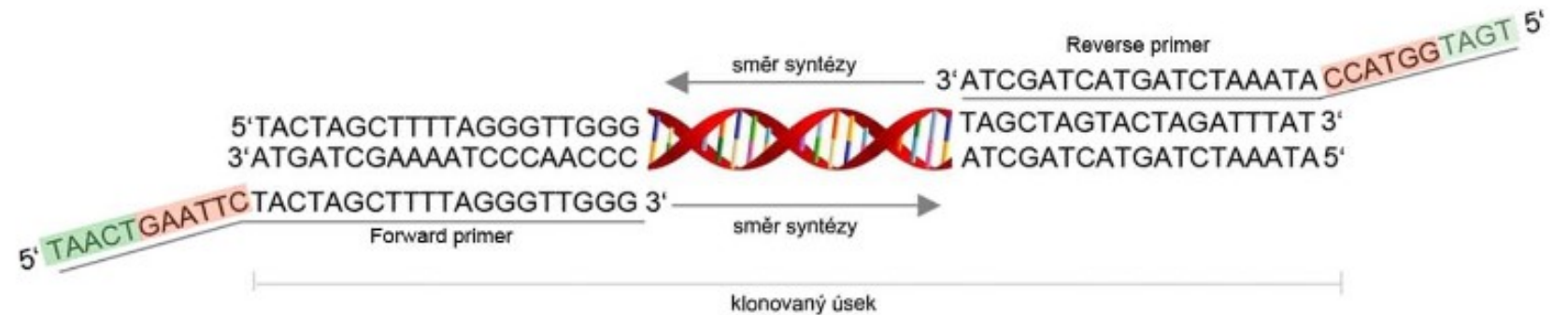
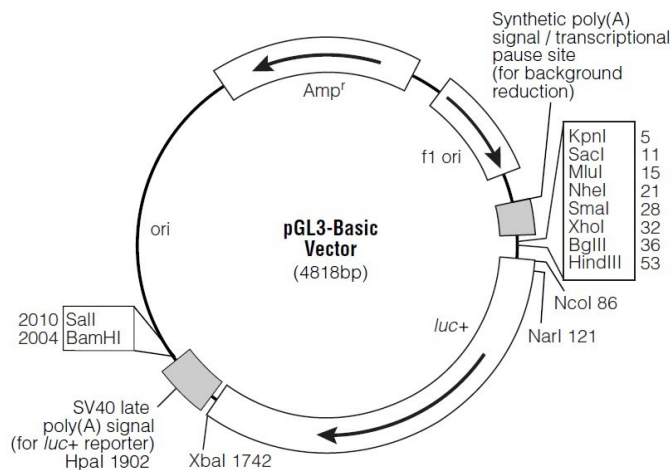
Forward primer 5' **TA**ACT**GA**ATTC**TACTAGCTTTTAGGGTTGGG** 3'  
Reverse primer 5' **TG**AT**GGTACC**AATAATCTAGTACTAGCTA3'



# Vyzkoušejte si...DU8-1.část

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

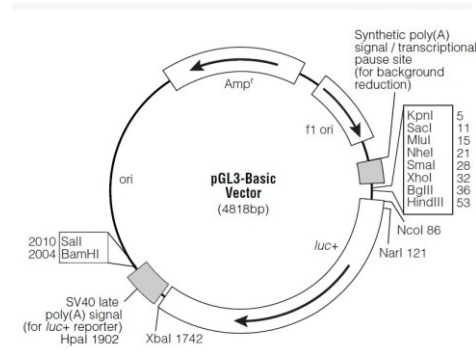
- kontrolujte sekvenci, které RE budou vhodné (tj. cílová sekvence neobsahuje příslušná štěpná místa)
- vloďte příslušné sekvence do primerů pro PCR
- “vyladte”  $T_m$  obou primerů, aby se příliš nelišily (odebírání, přidávání (náhodných) nukleotidů a kontrola v OligoCalc)





# DÚ8 – Návrh primerů-řešení

DÚ7 >NM\_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA  
 2) **ATGGTCGGCAGAAAGAG**CACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG  
 AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT  
 CAATCCCATCATTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCCGCGAACTTTCAGTATCCTGCC  
 GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG  
 CCGCAGACCTTGTGATATCCAGTTC CCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCATTCTGAAAGGCTGGTT  
 TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCTTCCGGAGT  
 AAGAAGGCAGTGCCTTCCATCACCACCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCGCAAGGGATCCACGGGG  
 ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATT CAGAGTGGCATCTGTGATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAAC  
 TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCGAATCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA  
 CGCCTGGAGAAATTTGGGATGAGACACCACCTGATTTTGC TCCAAGCAGCCCTTTGACCTAAACTTCC  
 AGGCAGGATTC TTAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG  
 CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGAT**CAAAGCTAGAAAATGA**



KpnI ggtac c	none
HindIII a agctt	none

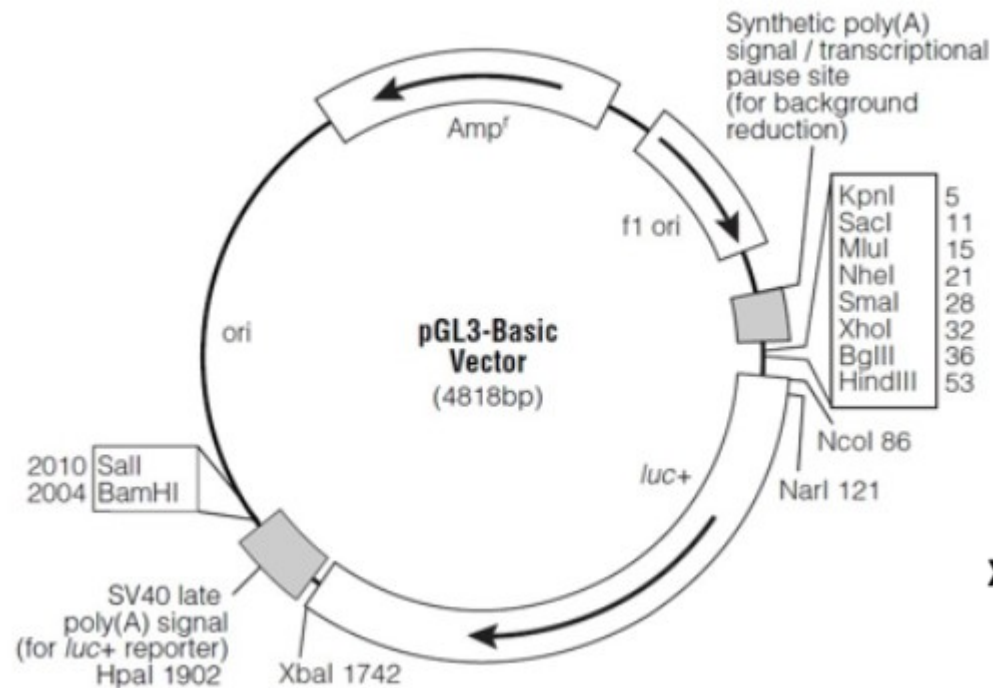
F: TTA GGT ACC ATG GTC GGC AGA AG  
 R: TGG AAG CTT TCA TTT TCT AGC TTT G

1) 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

# DU8-1.část

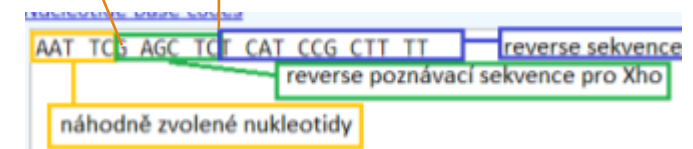
Návrh primerů obsahujících restrikční místa:



Start - ATG

STOP (nebo ne – podle typu experimentu)

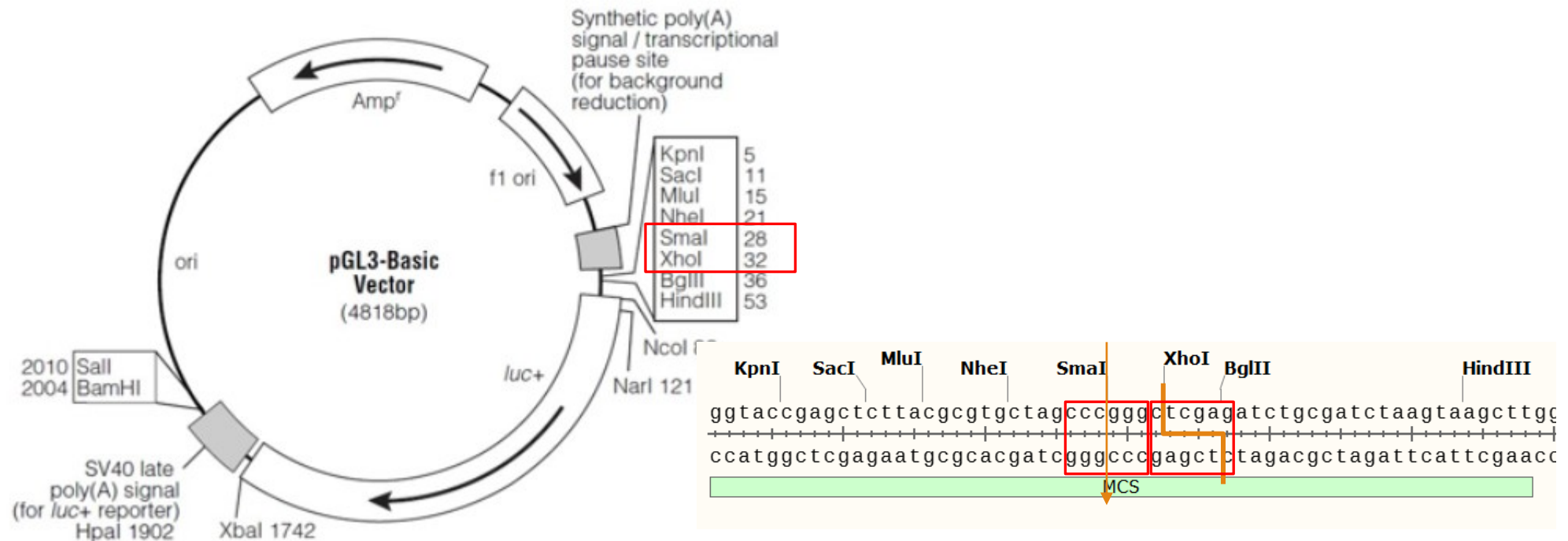
**XhoI** – poznávací sekvence - C|TCGAG pro reverse primer ~~G|AGC TC~~





# DU8-1.část

Návrh primerů obsahujících restrikční místa:



# DU8-1.část

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

-> příliš vysoká teplota, uberu nukleotidy

výsledný primer: ACG ACG CGT ATG CCC CGC AT ( $T_M=64.6^\circ\text{C}$ )

ATT ACG CGT ATG CCC CGC ATA GA ( $T_M=64.6^\circ\text{C}$ )

Melting Temperature ( $T_M$ ) Calculations	
62%	<u>1</u> 67.2 °C (Basic)
	<u>2</u> 76 °C (Salt Adjusted)
ms.	<u>3</u> 69.32 °C (Nearest Neighbor)

## Potential hairpin formation :

5' GCAAAGCTTTCAGGCCTTGCTCA 3'

3' Complementarity:  
None!

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

5' GCAAAGCTTTCAGGCCTTGCTCA 3'  
3' ACTCGTCCGGACTTTCGAAACG 5'

5' GCAAAGCTTTCAGGCCTTGCTCA 3'  
3' ACTCGTCCGGACTTTCGAAACG 5'

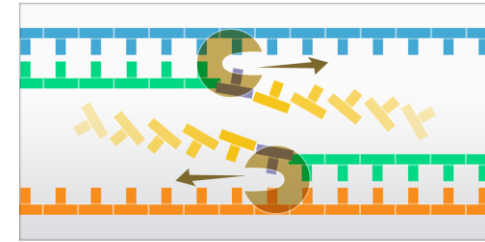
## Nukleotidová bioinformatika IV

### Cíle:

Student bude schopen navrhnout primery pro amplifikaci DNA s vloženými restrikčními místy pro následné klonování.

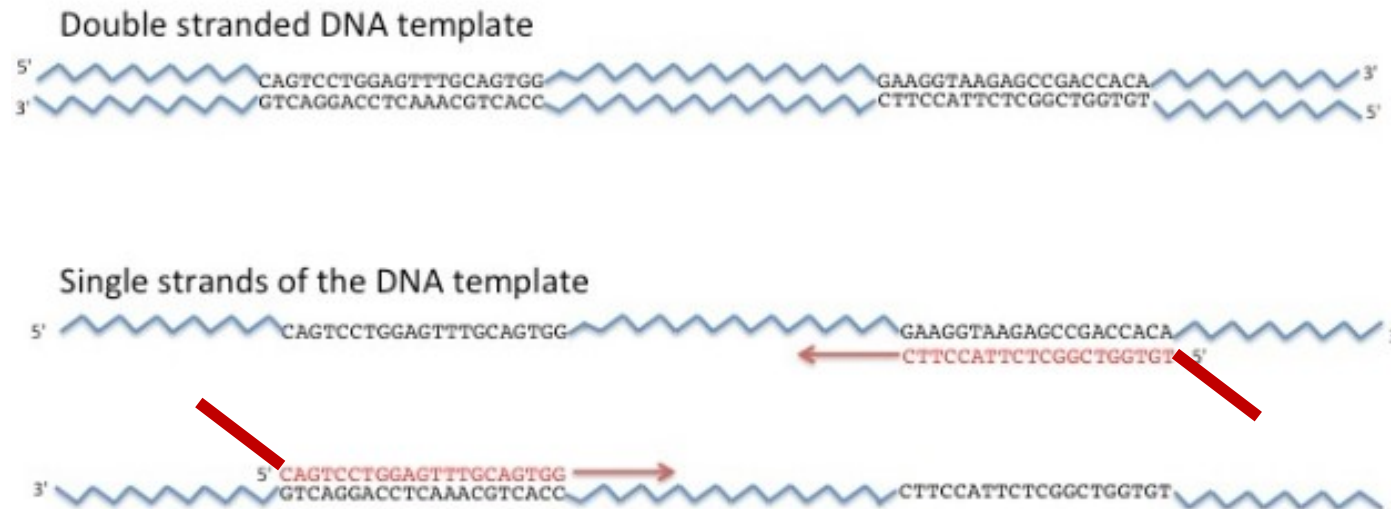
..a primery **pro detekci konkrétního genu**, kvantitativní stanovení vybraného genu (qPCR) a zkontrolovat zda primery uvedené v publikacích jsou v dostatečné kvalitě.

# Polymerázová řetězová reakce



1) Amplifikace (namnožení) požadovaného úseku DNA (genu, fragmentu) / **specifické (+RE)**

→ manuální návrh



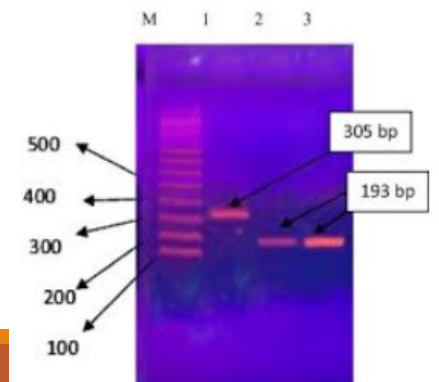
# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)
- A „rozumná“ délka ampliconu/produktu (200-500nt)



„End point“ detekce



# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)
- A „rozumná“ délka ampliconu/produktu (200-500nt)

The screenshot shows the NCBI GenBank interface for the entry NM\_000903.2. The main title is "Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA". The "Pick Primers" button is highlighted with a red box. The interface includes a search bar at the top, a "Go to" menu, and a list of actions on the right side.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Help

GenBank Send to: Change region shown Customize view

**Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA**

NCBI Reference Sequence: NM\_000903.2

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: Analyze this sequence Run BLAST Pick Primers Highlight Sequence Features Find in this Sequence Show in Genome Data Viewer

Articles about the NQO1 gene Redox modulation of NQO1. [PLoS One. 2018] Enhanced glycometabolism as a mechanism of NQO1 po [Biochem Biophys Res Commun. 2018] RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is requi [BMC Biol. 2017]

LOCUS NM\_000903 2601 bp mRNA linear PRI 29-MAR-2018

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

ACCESSION NM\_000903

VERSION NM\_000903.2

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2601)

AUTHORS Cheng X, Liu F, Liu H, Wang G and Hao H.

TITLE Enhanced glycometabolism as a mechanism of NQO1 potentiated growth of NSCLC revealed by metabolomic profiling

JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 496 (1), 31-36 (2018)

PMID 29291405

# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)

**Primer-BLAST** *A tool for finding specific primers*

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

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

**PCR Template**

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

NM\_000903.2

Range

Forward primer   [Clear](#)

Reverse primer

Or, upload FASTA file

**Primer Parameters**

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)  [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)  [Clear](#)

PCR product size

Min  Max

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>)

Min  Opt  Max  Max T<sub>m</sub> difference  [Clear](#)

**Exon/intron selection**

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span  [Clear](#)

Exon junction match

Exon at 5' side  Exon at 3' side

# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)

Primer-BLAST *A tool for finding specific primers*

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

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

**PCR Template**

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

Range

Forward primer	From <input type="text" value="196"/>	To <input type="text"/>	<a href="#">Clear</a>
Reverse primer	<input type="text"/>	<input type="text" value="1016"/>	

Or, upload FASTA file  [Procházet...](#)

**Primer Parameters**

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)  [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)  [Clear](#)

PCR product size	Min <input type="text" value="200"/>	Max <input type="text" value="500"/>		
# of primers to return	<input type="text" value="10"/>			
Primer melting temperatures (T <sub>m</sub> )	Min <input type="text" value="57.0"/>	Opt <input type="text" value="60.0"/>	Max <input type="text" value="63.0"/>	Max T <sub>m</sub> difference <input type="text" value="3"/>

**Exon/intron selection**

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match

Pro primery nasedající na CDS



# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database Refseq mRNA

Exclusion  Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism 9606  
Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.  
[Add more organisms](#)

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency  
Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including  
at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.  
Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size 4000

Allow splice variants  Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

[Get Primers](#)  Show results in a new window  Use new graphic view

[Advanced parameters](#) Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Pro primery nasedající pouze na lidské sekvence

# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode Automatic

Database Refseq mRNA

Exclusion  Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism 9606  
Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type.  
[Add more organisms](#)

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency  
Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including  
at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end.  
Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer.

Max target size 4000

Allow splice variants  Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

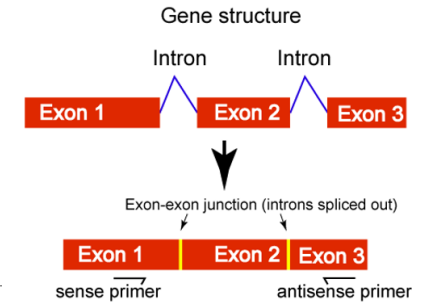
**Get Primers**  Show results in a new window  Use new graphic view

Advanced parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Pro primery nasedající pouze na lidské sekvence

# Polymerázová řetězová reakce



## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

NCBI/ Primer-BLAST : results: Job id=DwXQRHukdgxRNmAzbVNEARdIVTM6W04uOw [more...](#)

**Input PCR template** [NM\\_000903.2](#) Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA  
**Range** 196 - 1016  
**Specificity of primers** Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)  
**Other reports** [Search Summary](#)

**Graphical view of primer pairs**

100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800 850 900 950 1 K 1,050 1,100

Genes

NP\_000894.1 NP\_000894.1 NP\_000894.1

exon exon exon exon

Primer pairs for job DwXQRHukdgxRNmAzbVNEARdIVTM6W04uOw

Primer 1 Primer 2

Primer 3 Primer 4

Primer 5

Primer 6 Primer 7

Primer 8

Primer 9

Primer 10

100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800 850 900 950 1 K 1,050 1,100

NM\_000903.2: 72..1.1K (1.1Kbp) Tracks shown: 3/12

# Polymerázová řetězová reakce

## 2) Detekce vybraného genu

- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)

### Detailed primer reports

#### Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCGAGTCTGTTCTGGCTTA	Plus	20	399	418	59.75	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GTGGATCCCTTGCAGAGAGT	Minus	20	677	658	59.09	55.00	6.00	2.00
Product length	279								

#### Products on intended target

>[NM\\_000903.2](#) Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA

product length = 279

```
Forward primer 1   GCCGAGTCTGTTCTGGCTTA  20
Template        399   ..... 418

Reverse primer 1   GTGGATCCCTTGCAGAGAGT  20
Template        677   ..... 658
```

#### Products on allowed transcript variants

>[NM\\_001025434.1](#) Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 3, mRNA

product length = 165

```
Forward primer 1   GCCGAGTCTGTTCTGGCTTA  20
Template        399   ..... 418

Reverse primer 1   GTGGATCCCTTGCAGAGAGT  20
Template        563   ..... 544
```

# Vyzkoušejte si....

---

....navrhnout **specifické** primery pro **detekci** „vašeho“ genu  
(v oblasti CDS) pomocí primer BLAST – **součást DU8-2.část**

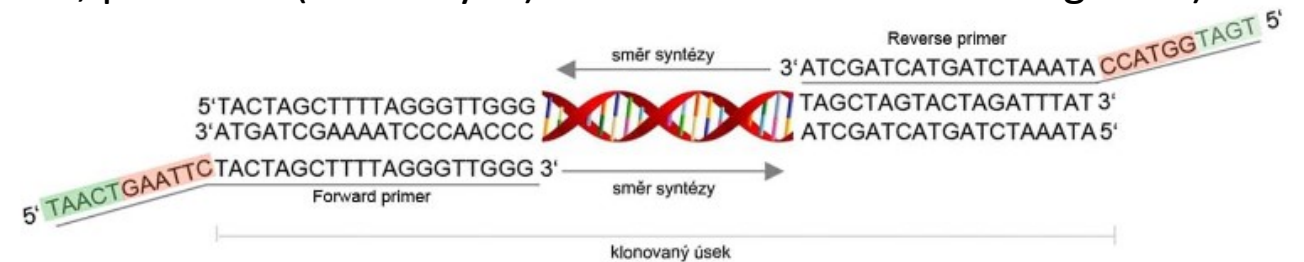
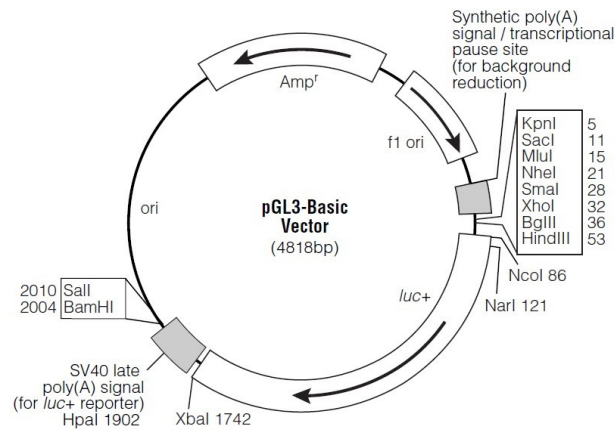
# DU8

1) navrhnete 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

→ “vyladte”  $T_m$  obou primerů, aby se příliš nelišily (odebírání, přidávání (náhodných) nukleotidů a kontrola v OligoCalc)



2) navrhnete primery pro DETEKCI vašeho genu (tak, aby produkt nebyl delší než 500 nukleotidů a kratší než 200nt)