Základy praktické Bioinformatiky

PETRA MATOUŠKOVÁ

2025/2026

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

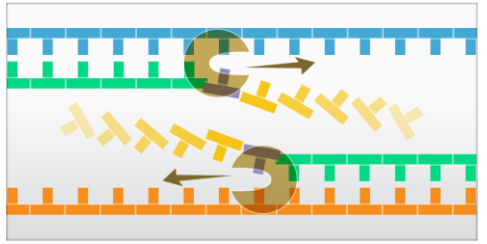
Téma 8/10

Nukleotidová bioinformatika IV

Cíle:

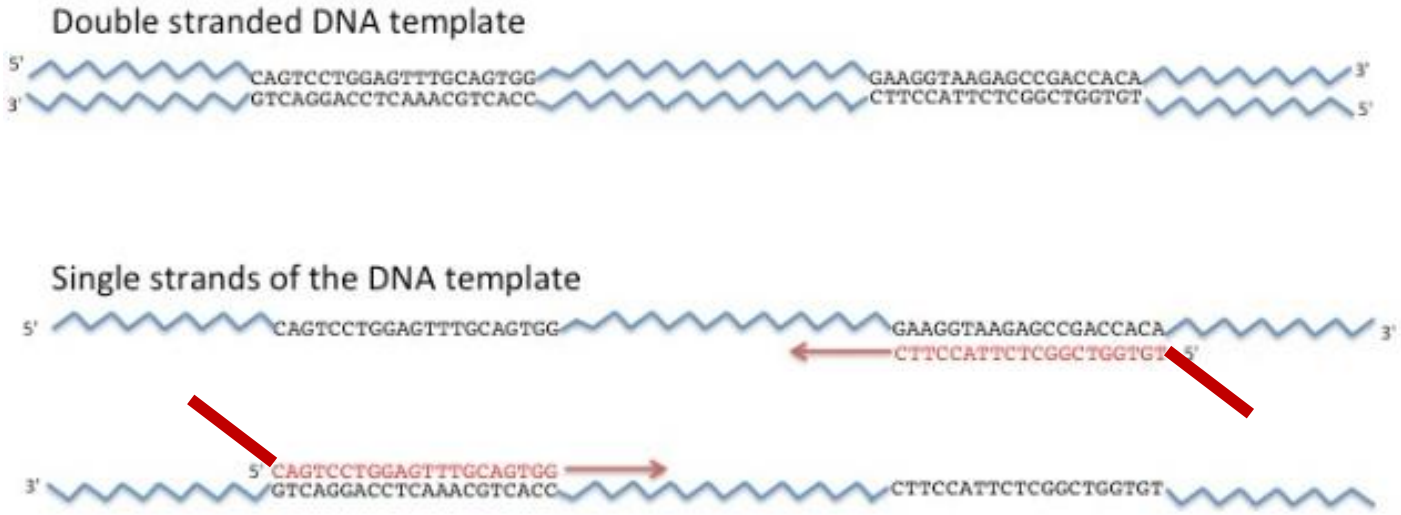
Student bude schopen navrhnout specifické primery pro detekci genu, bude schopen identifikovat konkrétní aminokyselinu a příslušný kódující triplet a navrhnout primery pro mutagenezi

Polymerázová řetězová reakce



1) Amplifikace (namnožení) požadovaného úseku DNA (genu, fragmentu)

→ manuální návrh

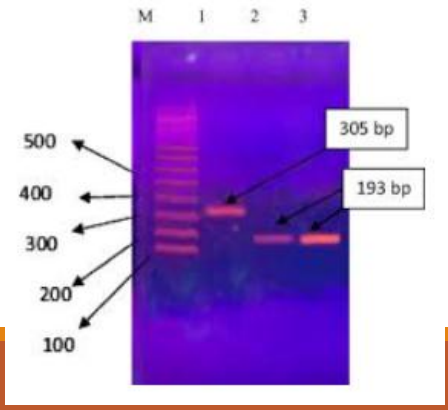


Polymerázová řetězová reakce

2) Detekce vybraného genu

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

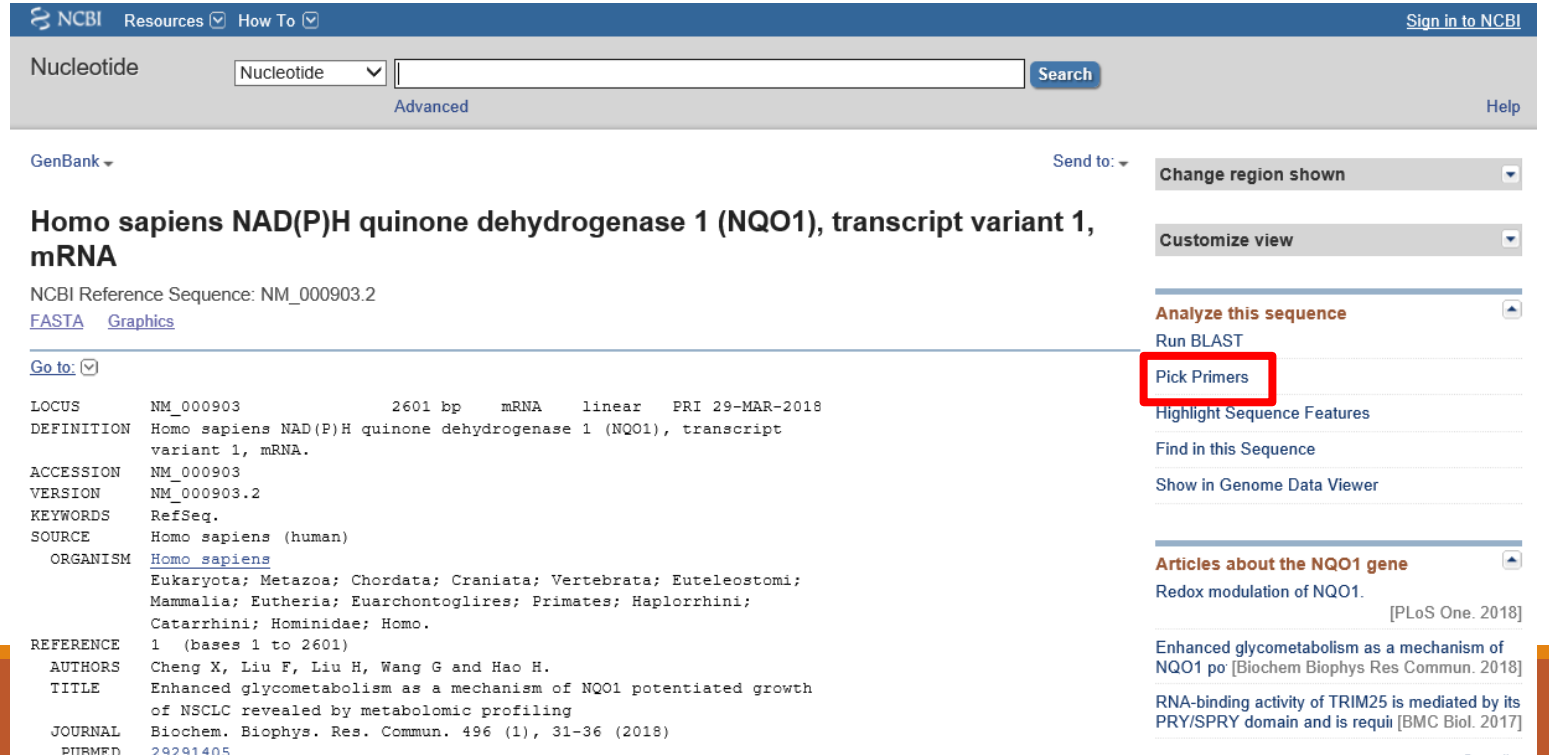
„End point“ detekce



Polymerázová řetězová reakce

2) Detekce vybraného genu

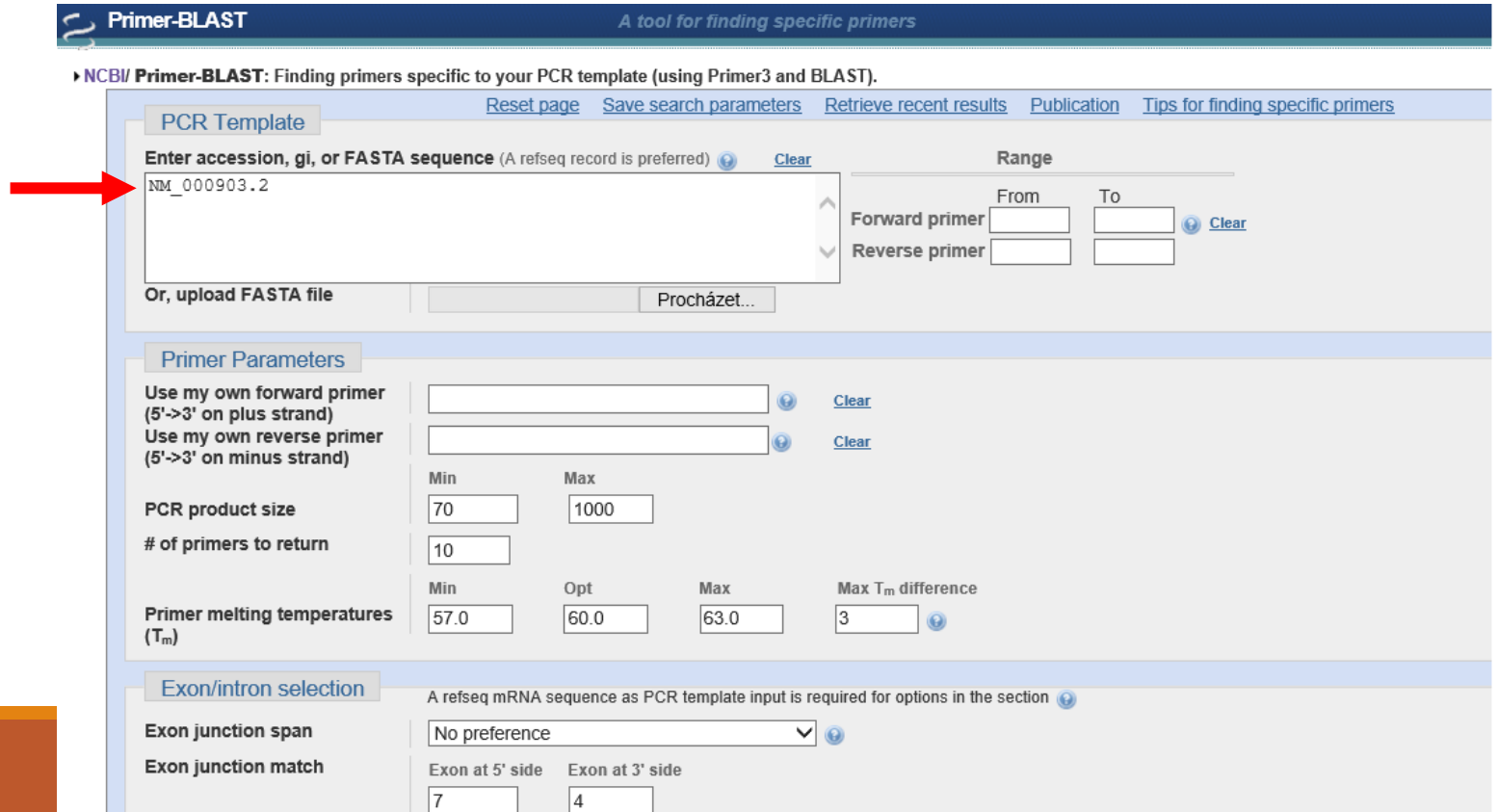
- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)
- A „rozumná“ délka amplikonu/produktu (200-500nt)



Polymerázová řetězová reakce

2) Detekce vybraného genu

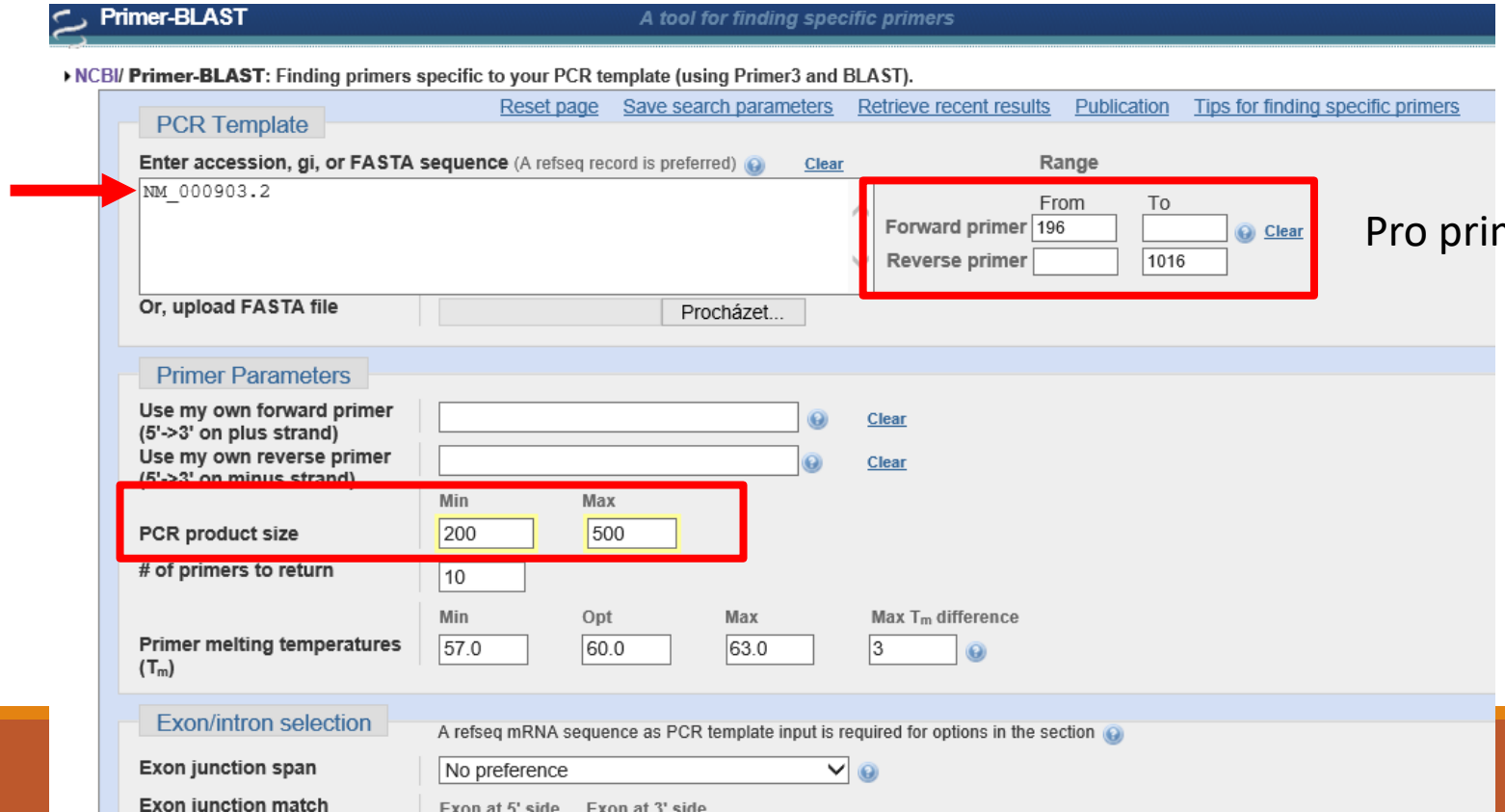
- nezáleží na konkrétním místě (v rámci nukleotidové sekvence, případně kódující oblasti)
- důležitá je specifita (Primer BLAST!)



Polymerázová řetězová reakce

2) Detekce vybraného genu

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

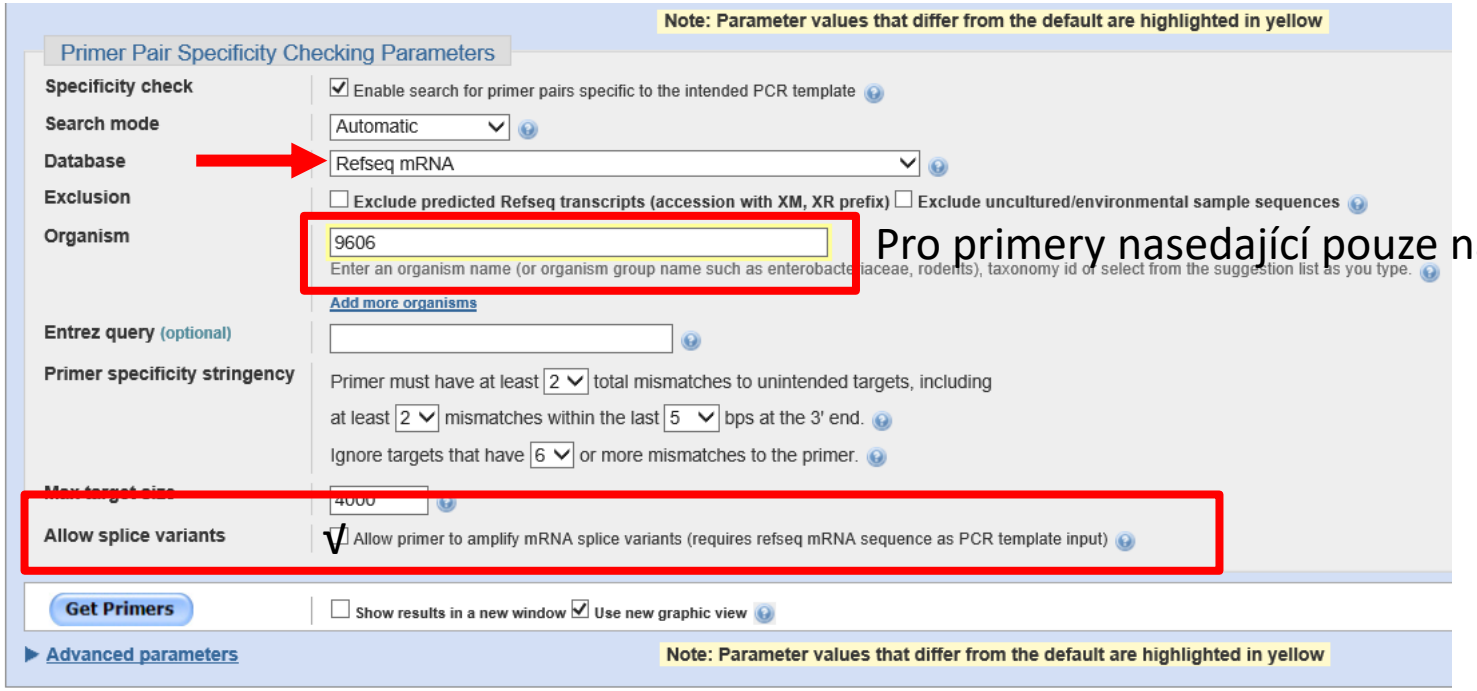


Pro primery nasedající na CDS

Polymerázová řetězová reakce

2) Detekce vybraného genu

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

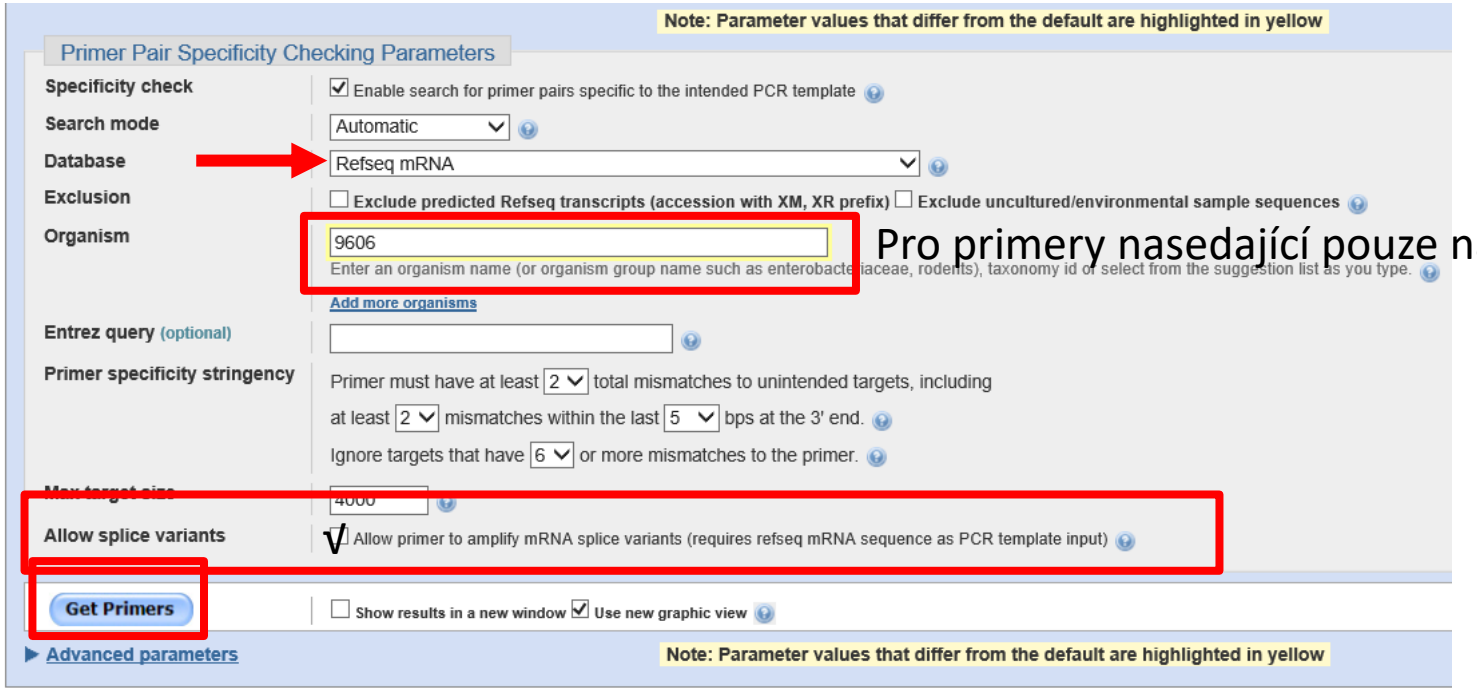


Pro primery nasedající pouze na lidské sekvence

Polymerázová řetězová reakce

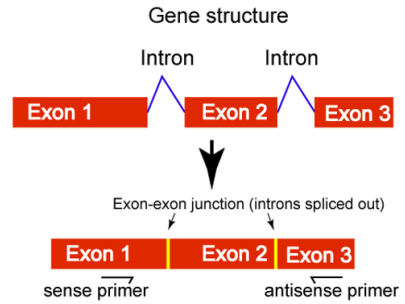
2) Detekce vybraného genu

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



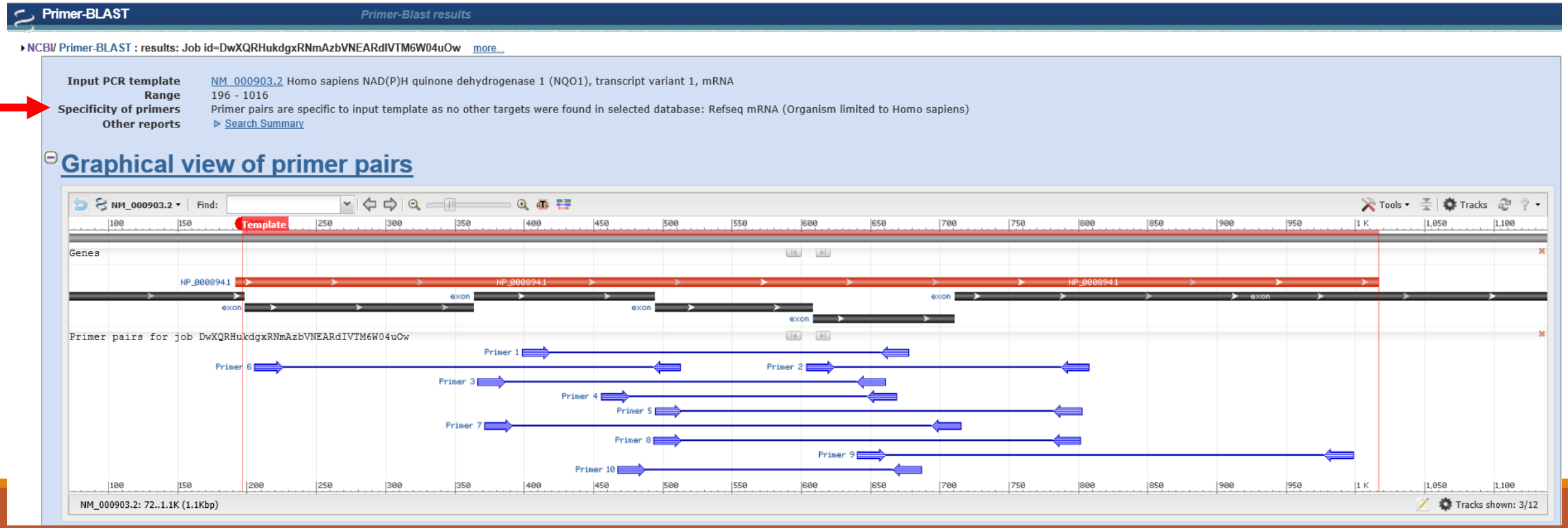
Pro primery nasedající pouze na lidské sekvence

Polymerázová řetězová reakce



2) Detekce vybraného genu

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



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
```

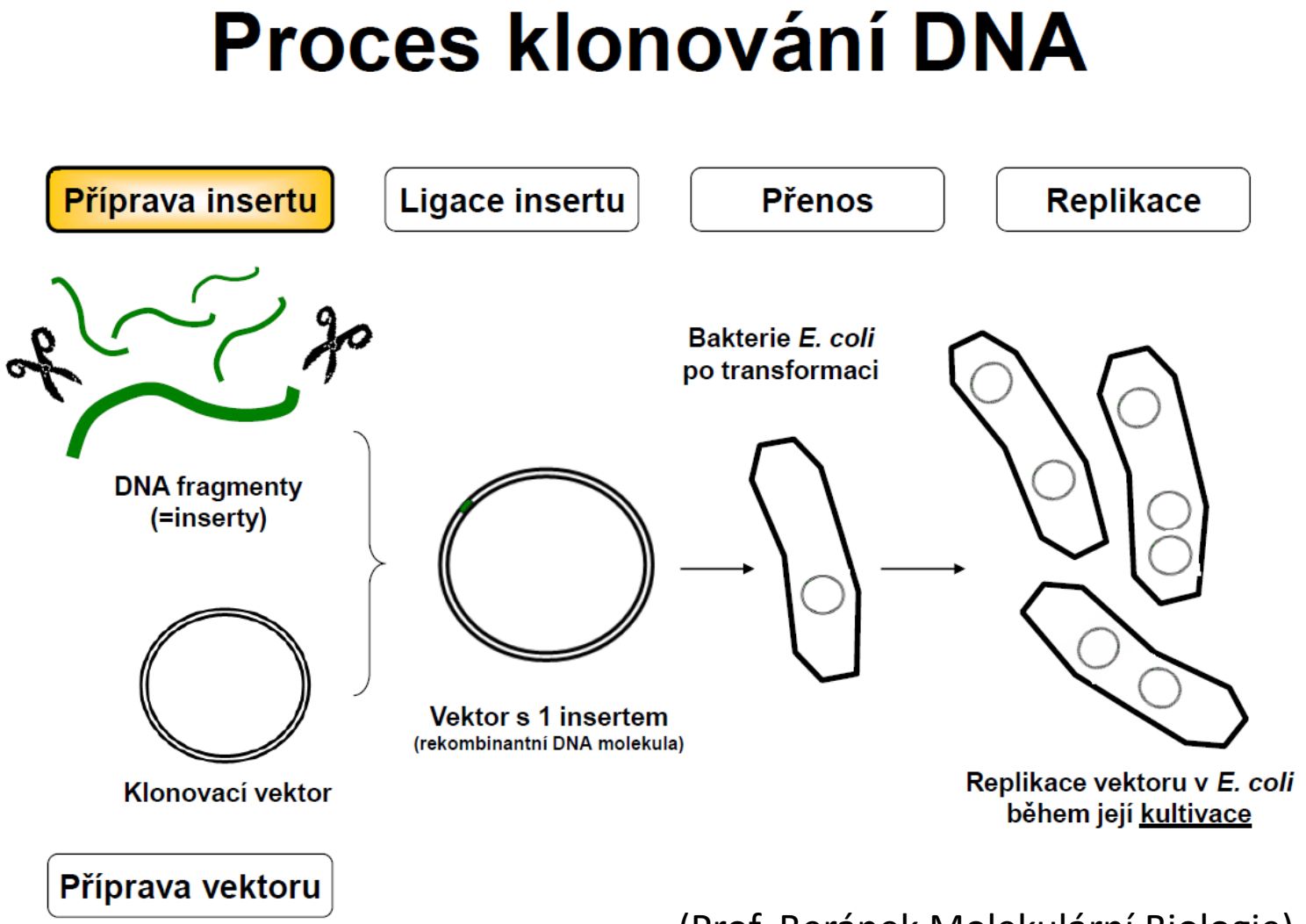
Vyzkoušejte si….

….navrhnout **specifické** primery pro **detekci** „vašeho“ genu

(v oblasti CDS) pomocí primer BLAST – součást DU8

Klonování

=namnožení úseku DNA



(Prof. Beránek Molekulární Biologie)

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

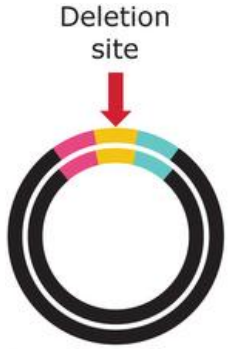
Mutace cílového místa pro RE, mikroRNA....

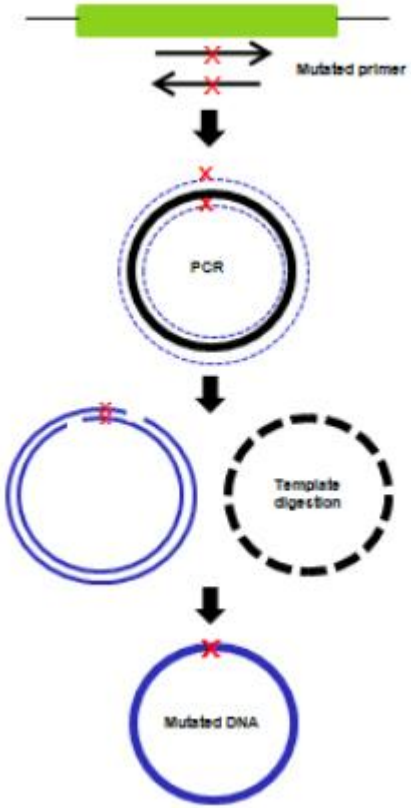
(site-directed mutagenesis)

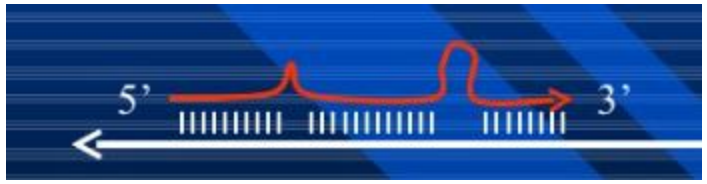
- Sekvenci máme v plasmidu (<10kB)

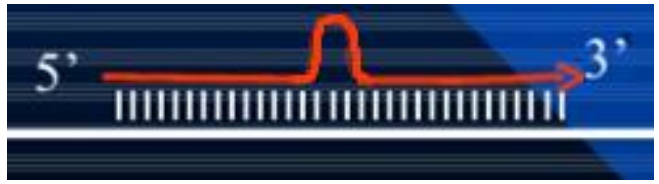
→ návrh mutačních primerů (F+R)

=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)

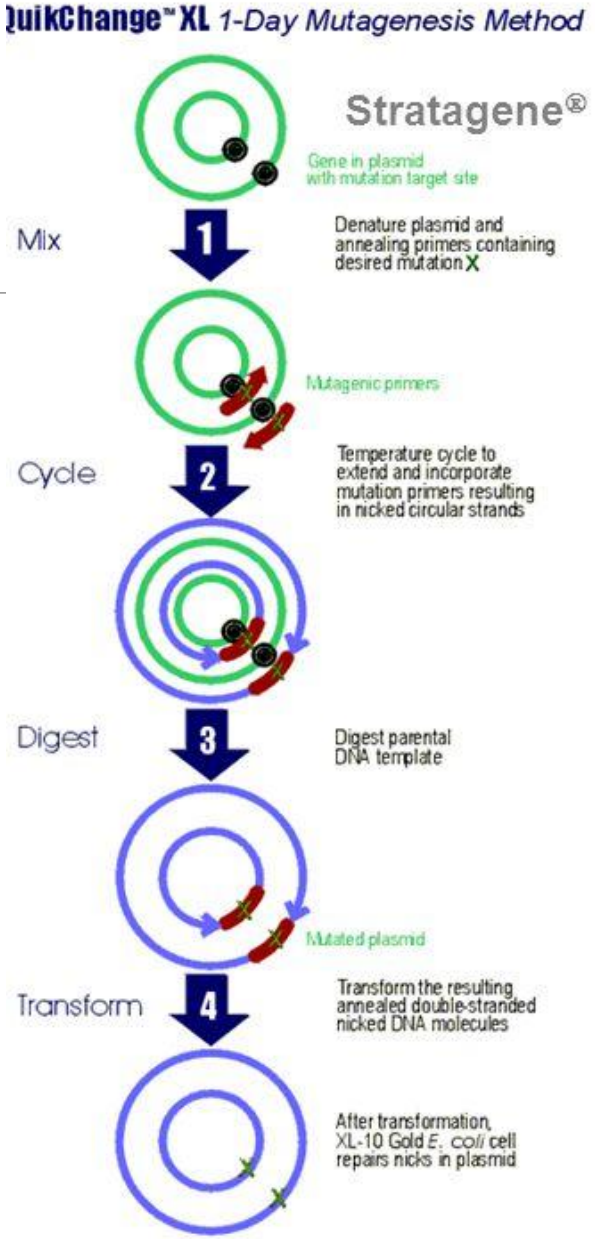
→ Návrh dvou mutačních primerů

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)



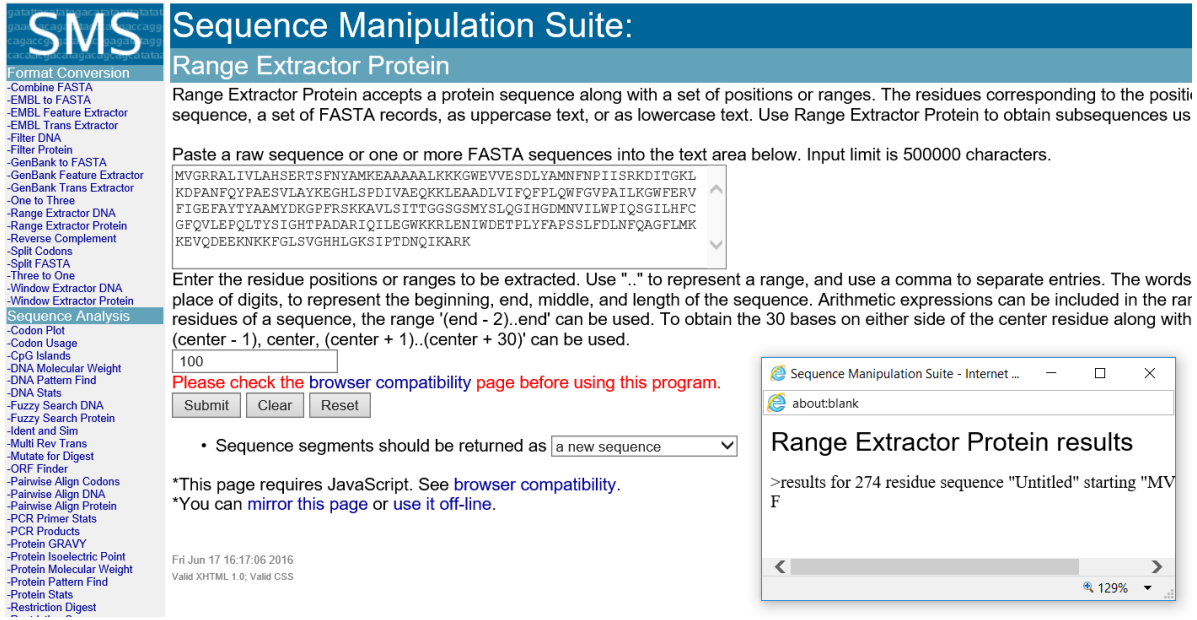
Klonování-Návrh primerů

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

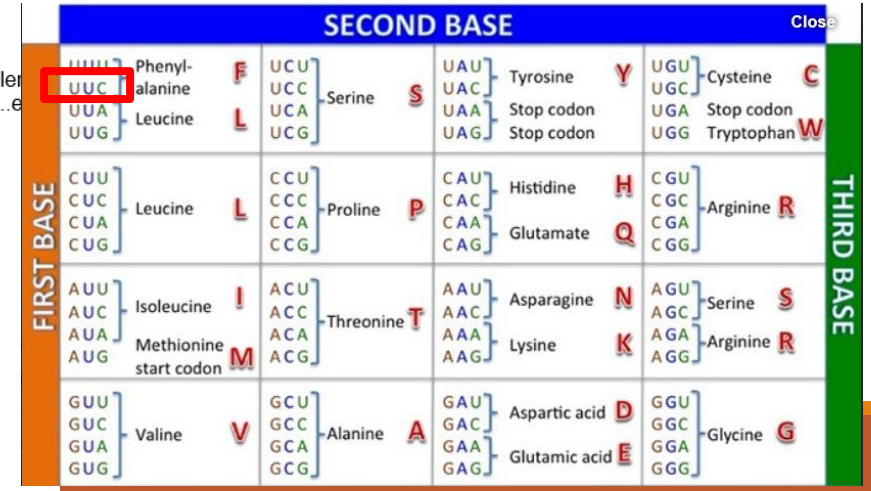
about:blank

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

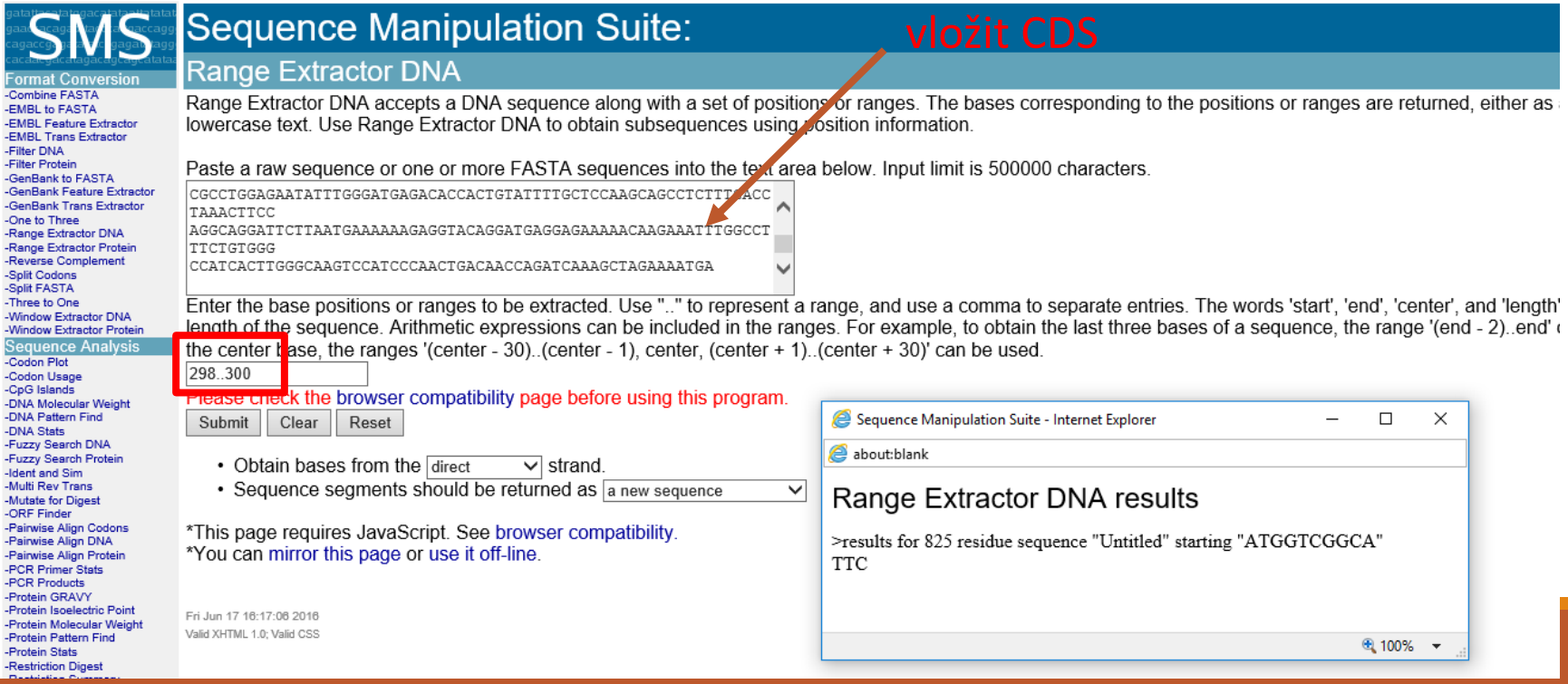


Klonování-Návrh primerů

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

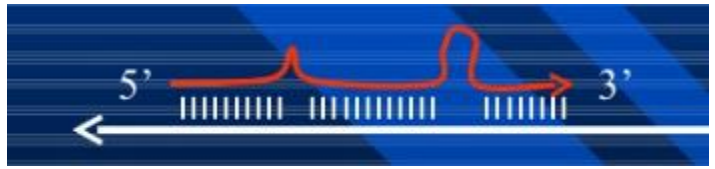
Vyzkoušejte si....

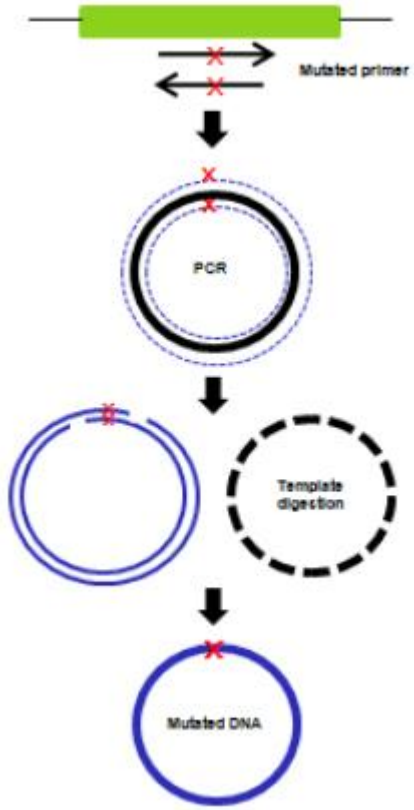
→identifikujte 100. aminokyselinu ve vašem proteinu
→jaký triplet jí kóduje ve vašem genu

Klonování-Návrh primerů – Pfu mutageneze

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

- identifikace 100.AMK (SMS/protein range extractor…“100“)
- v CDS nalezení správného tripletu





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

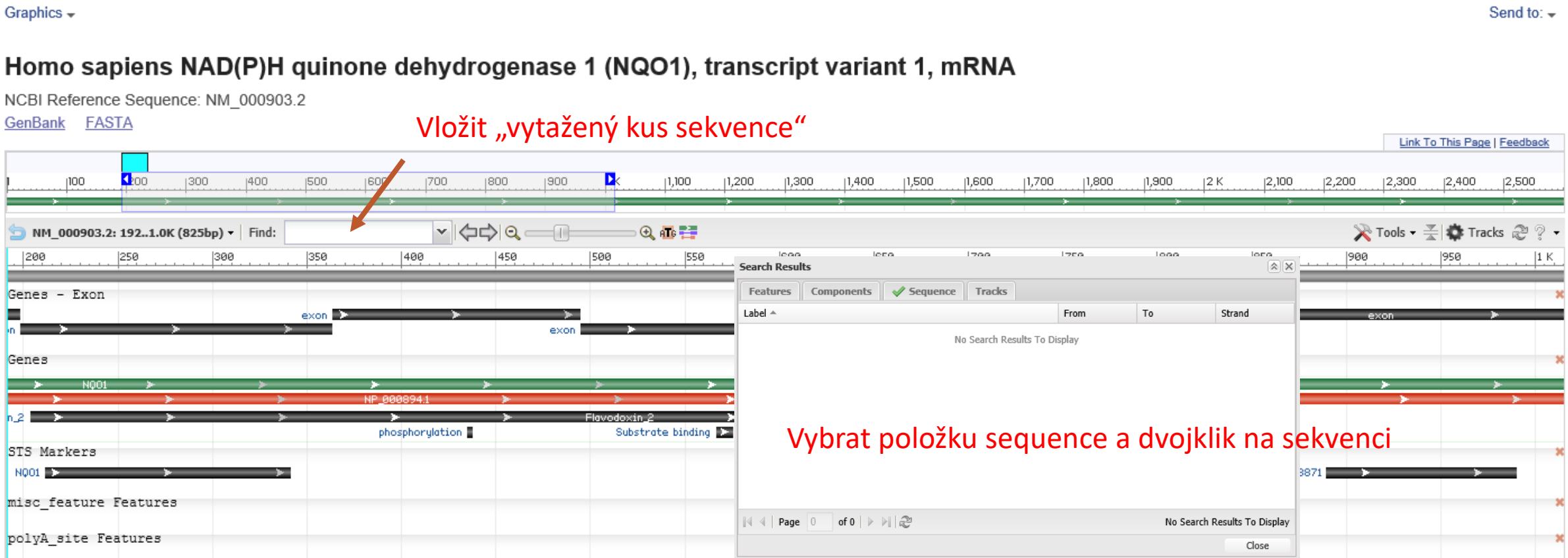
>results for 825 residue sequence "Untitled" starting "ATGGTCGGCA"
GACCTTGTGATATTCCAGTTCCCCCTGCAG

100%

Klonování-Návrh primerů

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

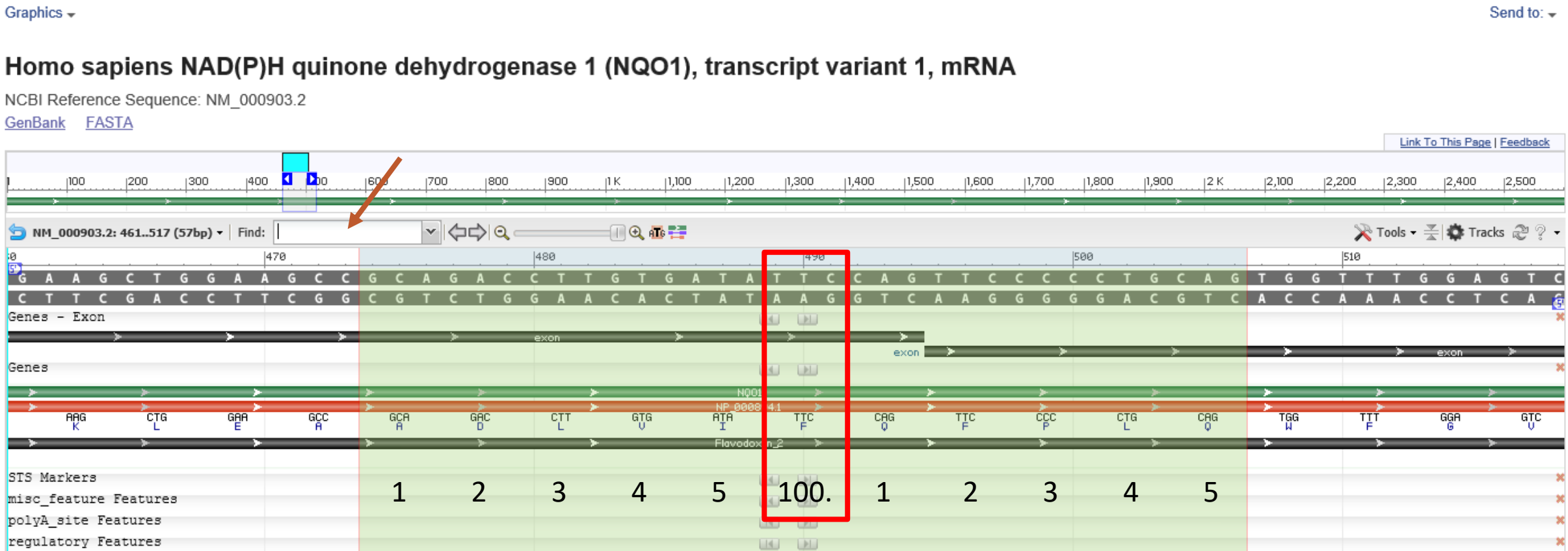
- Kontrola: „náhled“ sekvence: NCBI Graphic



Klonování-Návrh primerů

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

Kontrola: „náhled“ sekvence: NCBI Graphic



Vyzkoušejte si....

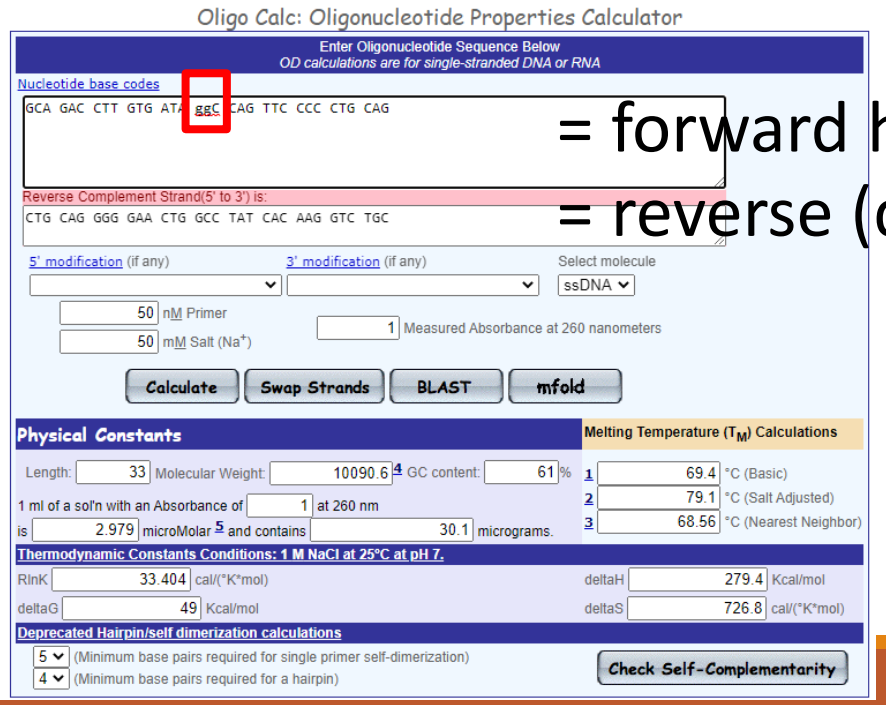
….navrhnout primery pro mutaci 100.AMK vašeho proteinu

→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)



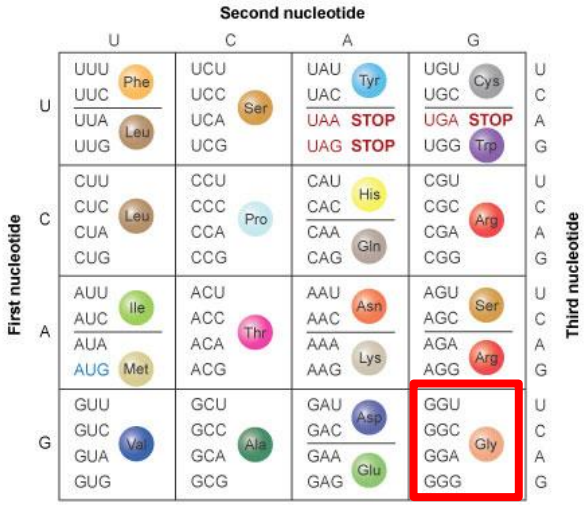
= forward horní primer

= reverse (dolní) primer

→manuálně mutovat F(TTC) na G(GGC)

Codon usage (NQO1)

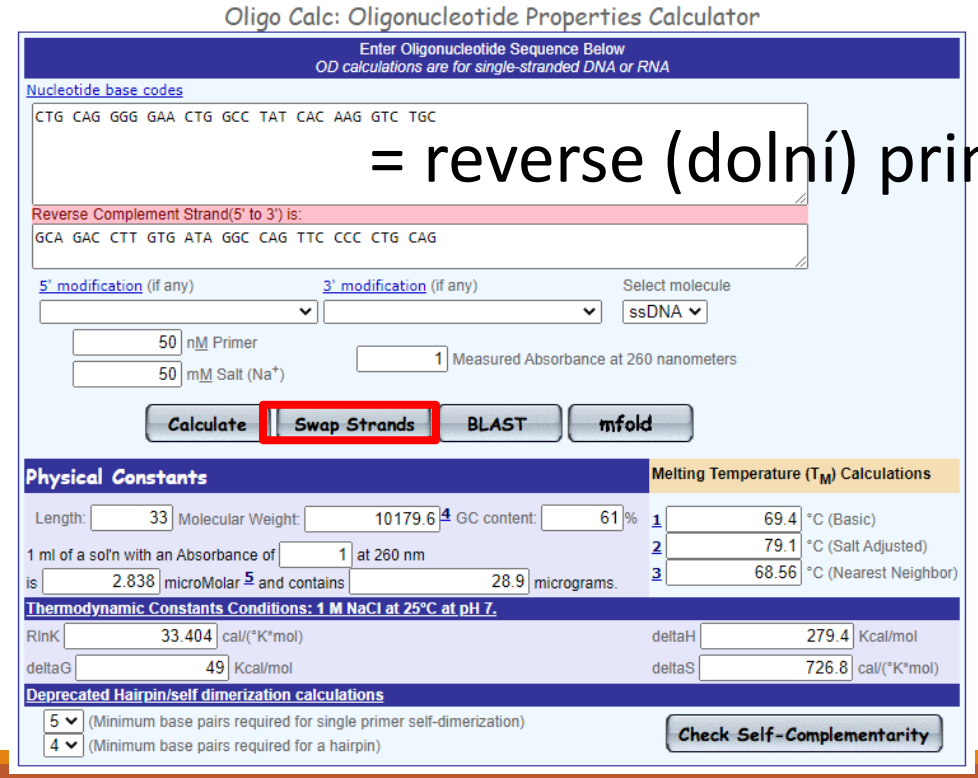
Gly	GGG	3.00
Gly	GGA	6.00
Gly	GGT	2.00
Gly	GGC	10.00



Klonování-Návrh primerů

„mutujte“ 100.aminokyselinu na Glycin (G)

Rozdělení na kodony a identifikace potřebného kodonu(OligoCalc)



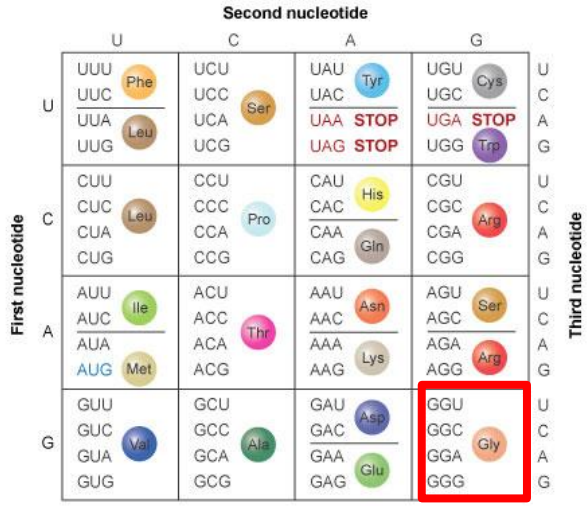
= reverse (dolní) primer

→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)

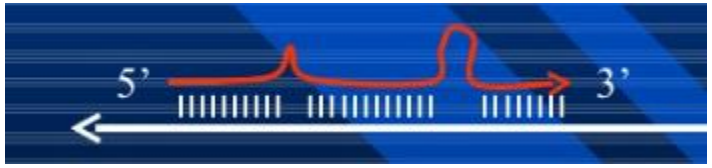
→manuálně mutovat F(TTC) na G(GGC)

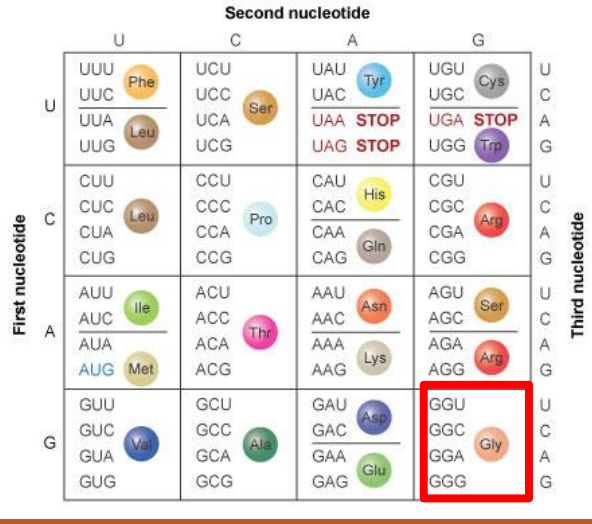
Pro NQO1: mutace: „F100G“

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

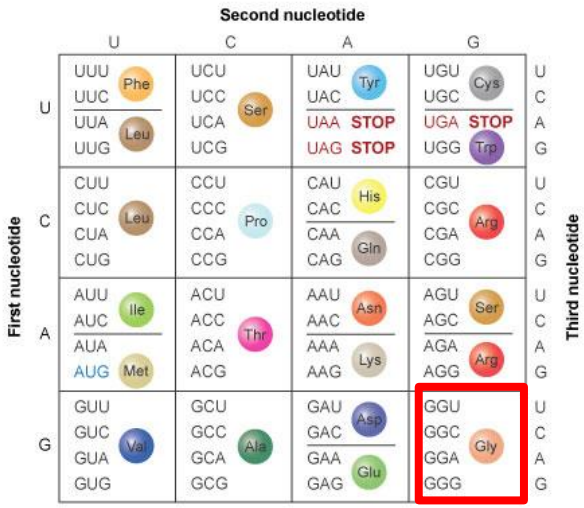
Nucleotide base codes

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….(DU8-2.)

….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

DU8

1) Navrhněte **specifické** primery pro **detekci** „vašeho“ genu v oblasti CDS, s produktem „vhodné“ délky

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)