

Základy praktické Bioinformatiky

PETRA MATOUŠKOVÁ

2024/2025

7/10

Nukleotidová bioinformatika III

Cíle:

Student bude schopen navrhnout primery pro namnožení požadovaného úseku genu a navrhnout primery pro detekci genu.

„Bioinformatika nukleových kyselin II“

Vyhledávání NK sekvencí

Analýza vlastností sekvencí-složení, reverse complement, identifikace restričních míst (Palindromy)

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

Návrh primerů pro PCR, rt-PCR, bodovou mutagenezi

Předpověď sekundárních struktur

Porovnávání sekvencí, identifikace neznámé sekvence

(Vyhledání SNPs)

„čtení“ sekvenačních dat a spojování fragmentů

Vyhledávání hladin expresí jednotlivých genů

mikroRNA

Celé genomy

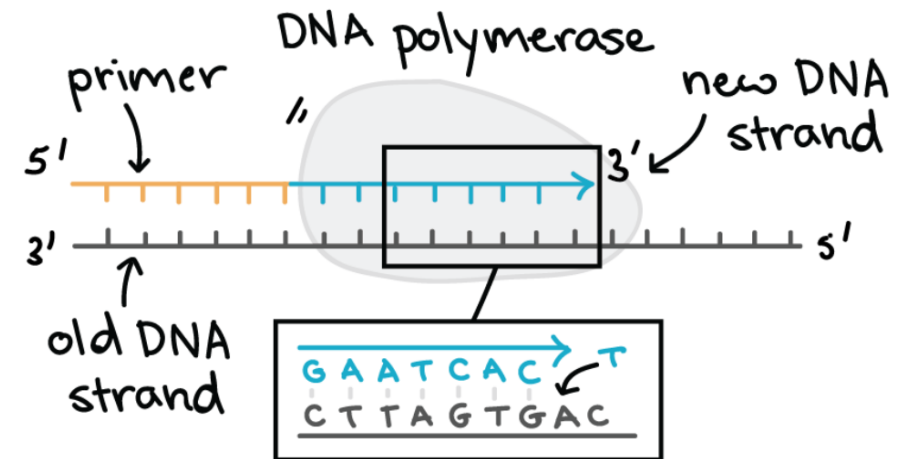
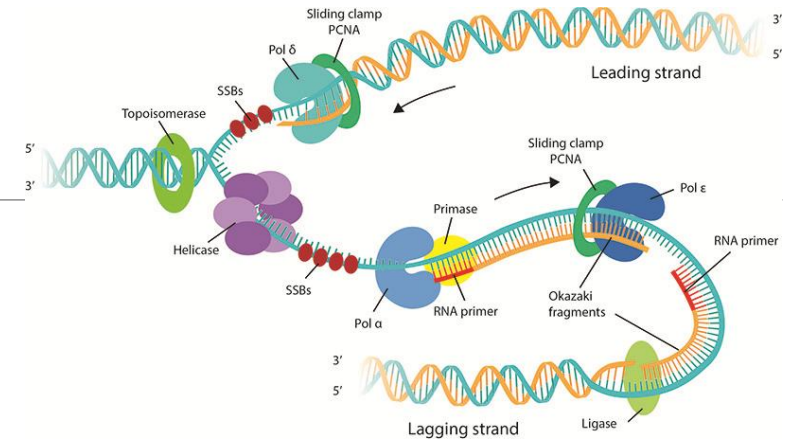
....

Primer = oligonukleotid

= krátký jednořetězcový úsek DNA

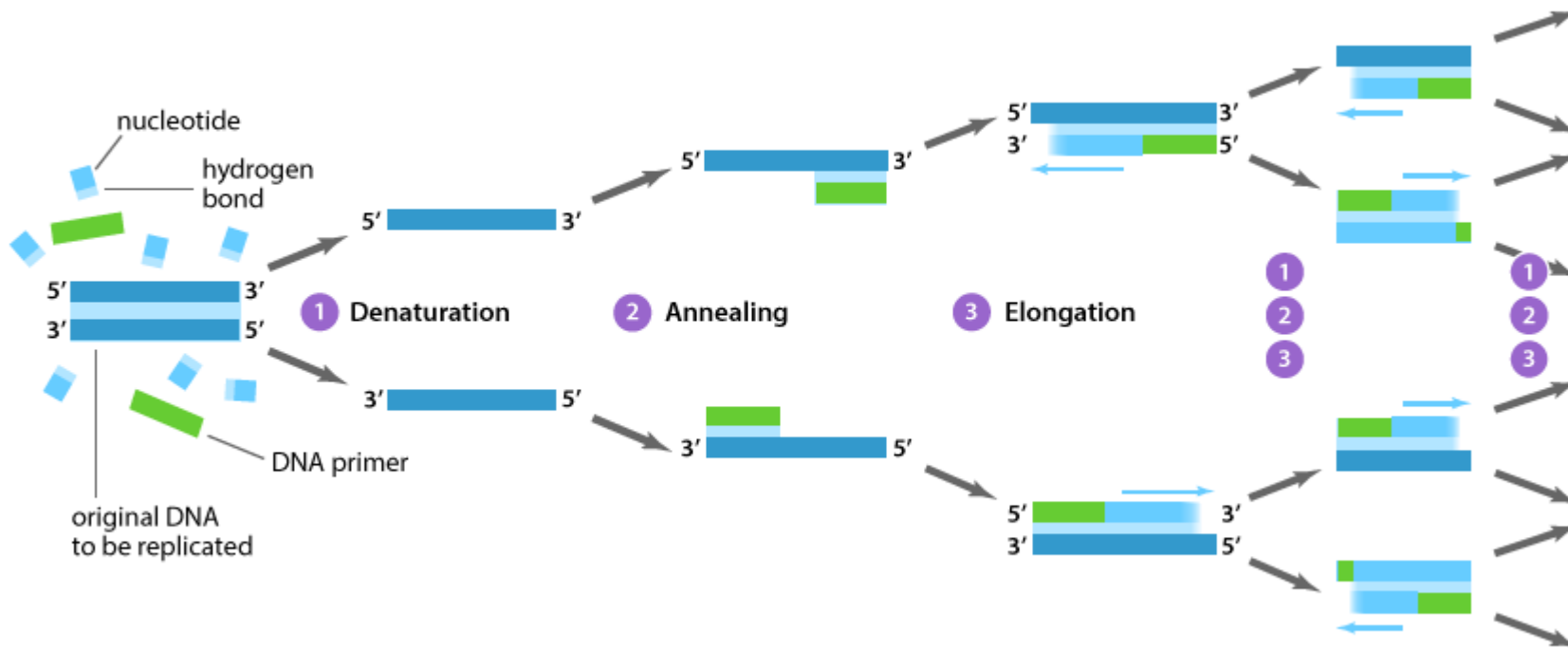
Použití:

- PCR (namnožení genu/úseku, detekce genu, mutace, RT-PCR...)
- Reverzní transkripce (oligo(dT), GSP, hexamers)
- sekvenování

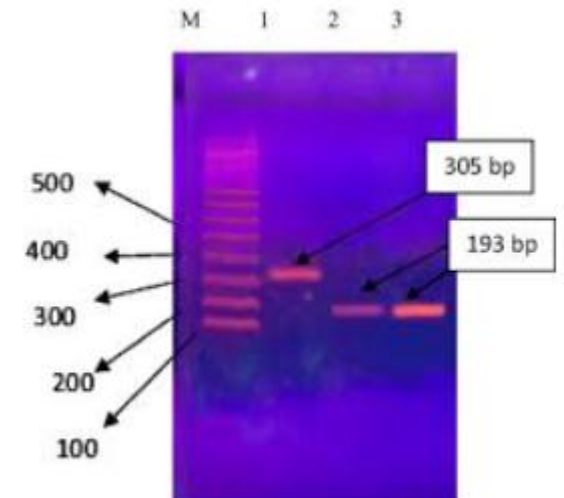


Polymerázová řetězová reakce

Polymerase chain reaction (PCR) → namnožení (amplifikace) úseku DNA vymezeného primery



→ „End point“ detekce



Polymerázová řetězová reakce

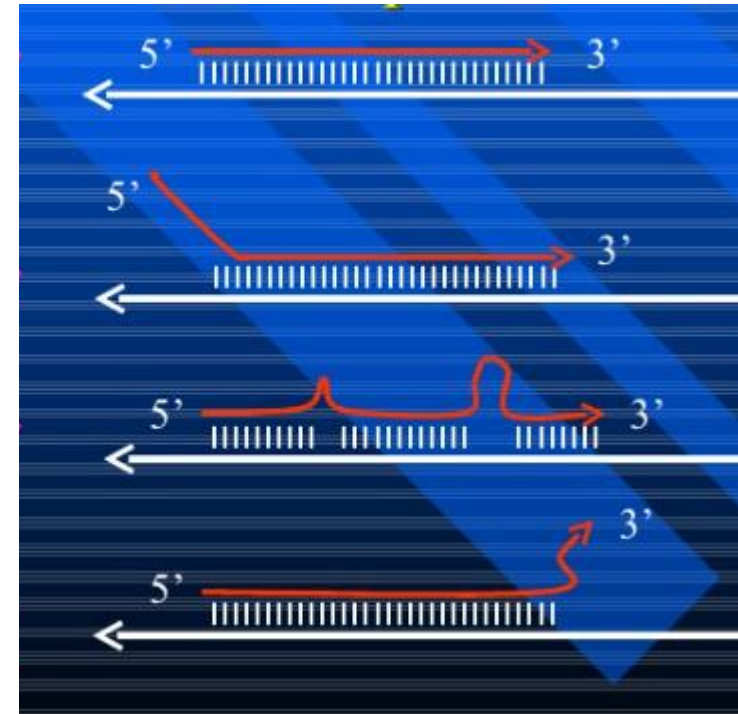
Polymerase chain reaction (PCR) → namnožení (amplifikace) úseku DNA vymezeného primery



Nasedání primerů a směr syntézy



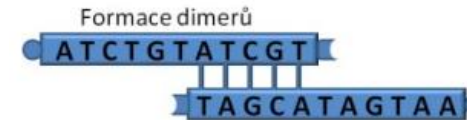
Syntéza: 5' → 3'



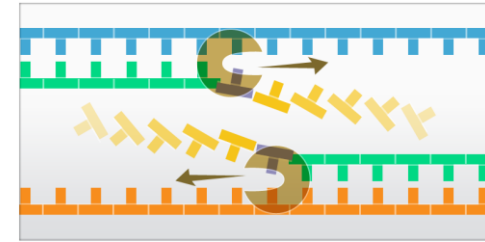
Polymerázová řetězová reakce

Charakteristiky „dobré“ dvojice primerů:

- Tm rozdíl (<math><1-3^{\circ}\text{C}</math>)
- Podobná délka (17-28nt)
- Podobné složení bází (GC \cong 50-60%)
- Nepřítomnost delších úseků ze stejných bází (>4)
- Nepřítomnost sekundárních struktur (vnitřní vlásenky)
- Nepřítomnost tvorby dimerů
- (Málo GC nukleotidů na 3' konci) ALE jeden G/C na úplném konci ano
 - (Specifičnost)

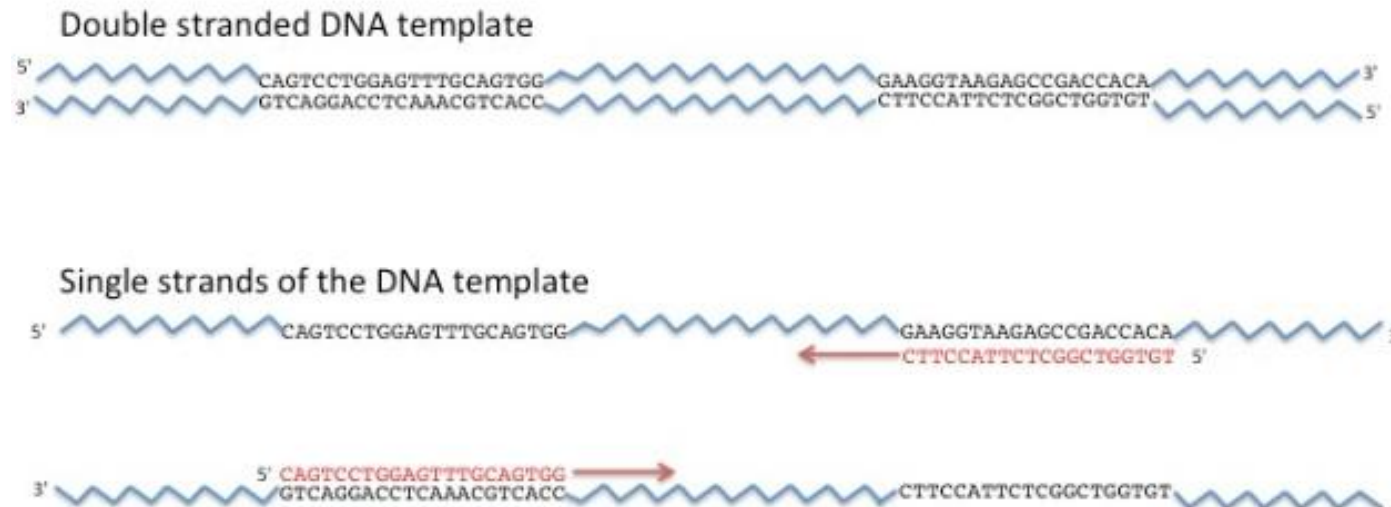


Polymerázová řetězová reakce

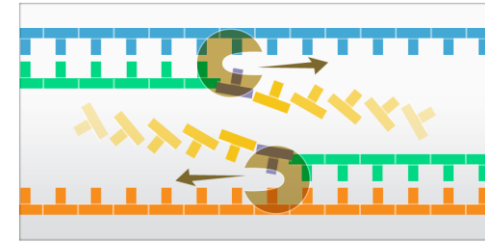


1) Amplifikace (namnožení) požadovaného úseku DNA (genu, fragmentu):

→ manuální návrh

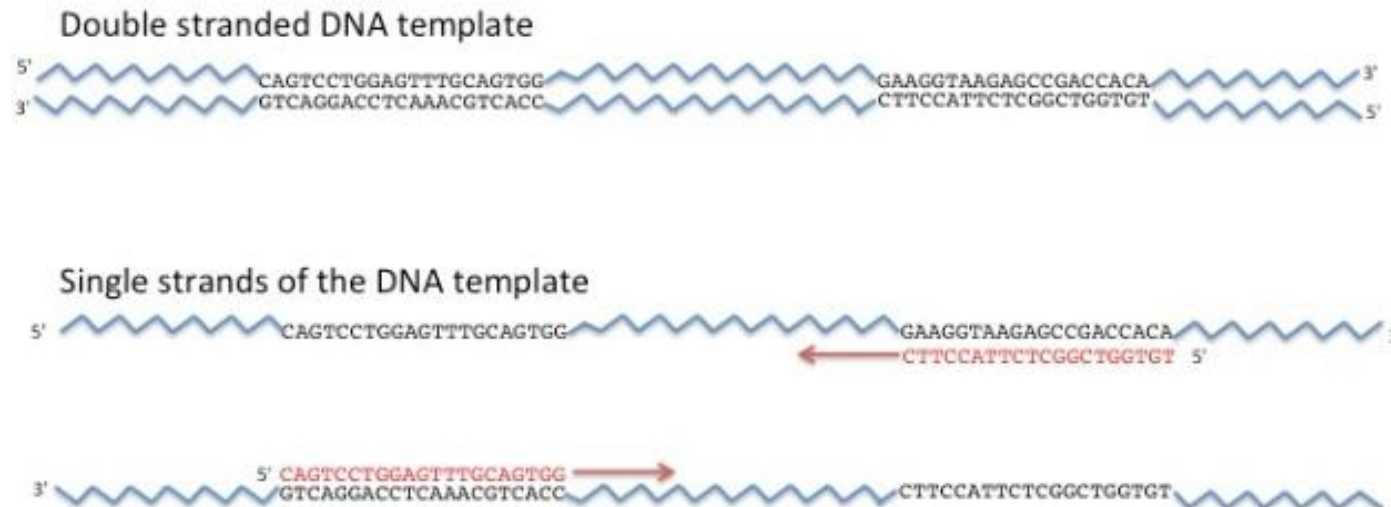


Polymerázová řetězová reakce

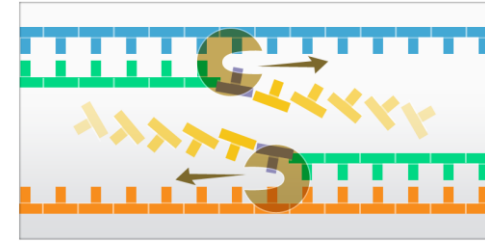


1) Amplifikace (namnožení) požadovaného úseku DNA (genu, fragmentu):

→ manuální návrh



Polymerázová řetězová reakce



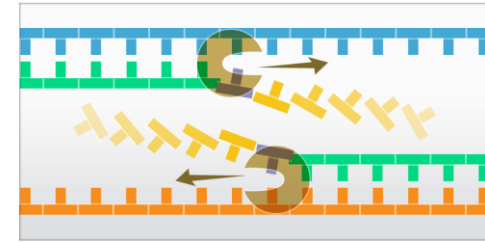
1) Amplifikace (namnožení) požadovaného úseku DNA (genu, fragmentu):

→ manuální návrh

➤ navrhňte (krátké) primery pro sekvenci:

5'-ATGCCCTTTCnnnnnnnnnnnnnnnnTAAATCCCGC-3'

Polymerázová řetězová reakce



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

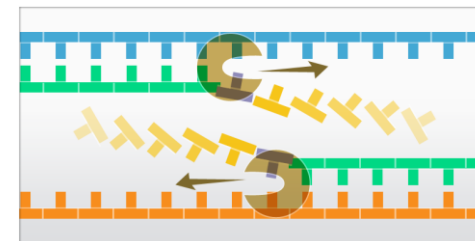
→ manuální návrh

➤ navrhňte (krátké) primery pro sekvenci:

5'-ATGCCCTTTCnnnnnnnnnnnnnnnnnnTAAATCCCGC-3'

3'-TACGGGAAAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnATTAGGGCG-5'

Polymerázová řetězová reakce



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

→ manuální návrh

➤ navrhňte (krátké) primery pro sekvenci:

5'-ATGCCCTTTCnnnnnnnnnnnnnnnnTAAATCCCGC-3'

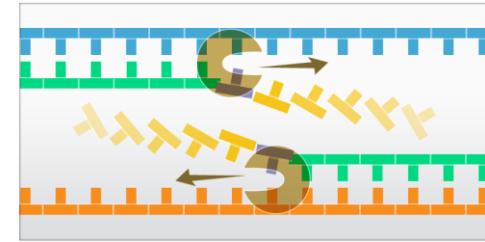
ATTAGGGCG-5'



5'-ATGCCCTTTC-

3'-TACGGGAAAGnnnnnnnnnnnnnnnnATTAGGGCG-5'

Polymerázová řetězová reakce



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

→ manuální návrh

➤ navrhňte (krátké) primery pro sekvenci:

R_primer: GCGGGATTTA

5'-ATGCCCTTTCnnnnnnnnnnnnnnnnnnTAAATCCCGC-3'

F_primer: ATGCCCTTTC

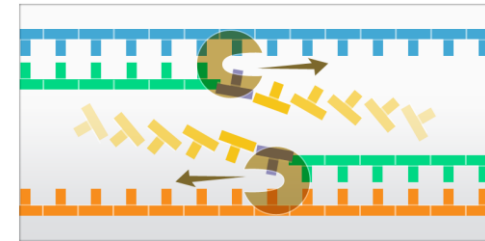
ATTAGGGCG-5'

5' - ATGCCCTTTC -

pro zápis finálních F a R primerů směr psaní 5'-3' !

3'-TACGGGAAAGnnnnnnnnnnnnnnnnnnATTAGGGCG-5'

Polymerázová řetězová reakce



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

→ manuální návrh

➤ navrhňte (krátké) primery pro sekvenci:

R_primer: **GCGGGATTTA**

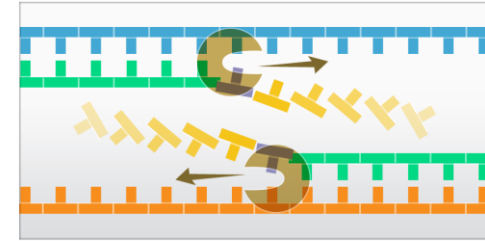
5'-ATGCCCTTTCnnnnnnnnnnnnnnnnTAAATCCCGC-3'

reverse complement:

5'-GCGGGATTTAnnnnnnnnnnnnnnnGAAAGGGCAT-3'

(**3'-TACGGGAAAGnnnnnnnnnnnnnnnnATTAGGGCG-5'**)

Polymerázová řetězová reakce



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

→ manuální návrh

➤ navrhňte (krátké) primery pro sekvenci:

R_primer: GCGGGATTTA

5'-ATGCCCTTTCnnnnnnnnnnnnnnnnTAAATCCCGC-3'

reverse complement:

5'-GCGGGATTTAnnnnnnnnnnnnnnnnnGAAAGGGCAT-3'

(3'-TACGGGAAAGnnnnnnnnnnnnnnnnATTAGGGCG-5')

PCR-amplifikace požadovaného úseku

→ manuální návrh: 2 primery

Forward

-horní primer

Reverse

-dolní primer (z „reverse complement“)

```
>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1  
(NQO1), transcript variant 1, mRNA  
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG  
AGGCTGCTGCAGGGCTTTGAAGAAGAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT  
CAATCCCATCATTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAGTGAAGGACCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC  
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG  
CCGCAGACCTTGTGATATCCAGTTCCTCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT  
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCTTCCGGAGT  
AAGAAGGCAGTGTCTTCCATCACCACCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG  
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACC  
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA  
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCCTGTATTTTGTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC  
AGGCAGGATCTTAAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG  
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```


PCR-amplifikace požadovaného úseku

→ manuální návrh: 2 primery

Forward primer

→ 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  
AGGCTGCTGCAGGGCTTTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT  
CAATCCCATCATTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAGTGAAGGACCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC  
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG  
CCGCAGACCTTGTGATATCCAGTTCCTCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT  
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCTTCCGGAGT  
AAGAAGGCAGTGTCTTCCATCACCACCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG  
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAAC  
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA  
CGCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCCTGTATTTTGTCCAAGCAGCCTTTGACCTAAACTTCC  
AGGCAGGATCTTAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTCTGTGGG  
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

PCR-kontrola manuálně navržených primerů: OligoCalc

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

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

Nucleotide base codes

CAG TAT CCT GCC GAG TCT GT

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:
ACA GAC TCG GCA GGA TAC TG

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule
50 nM Primer 1 Measured Absorbance at 260 nanometers ssDNA
50 mM Salt (Na⁺)

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

Physical Constants **Melting Temperature (T_M) Calculations**

Length: 20 Molecular Weight: 6084⁴ GC content: 55%
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm
is 5.042 microMolar⁵ and contains 30.7 micrograms.

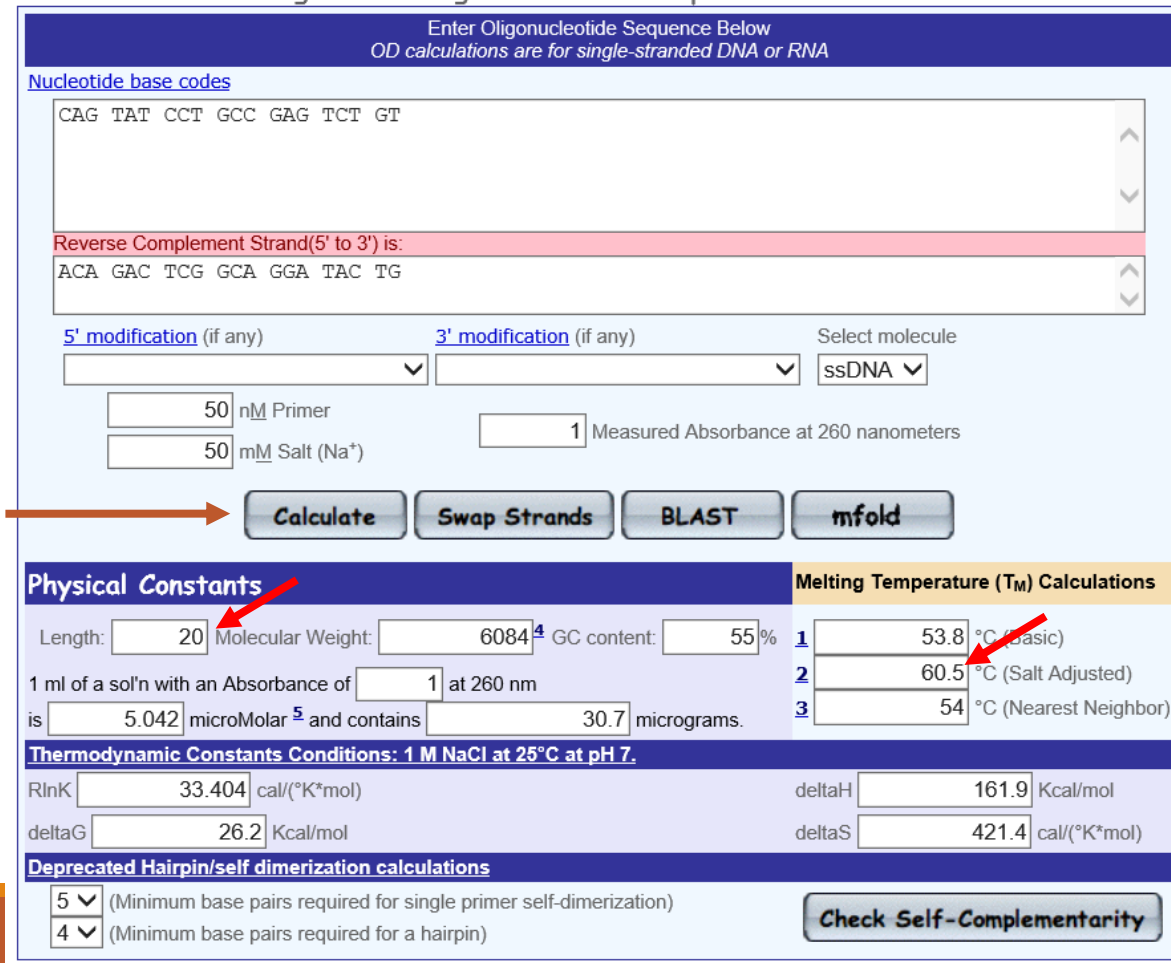
Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK 33.404 cal/(°K*mol) deltaH 161.9 Kcal/mol
deltaG 26.2 Kcal/mol deltaS 421.4 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



PCR-amplifikace požadovaného úseku

→ manuální návrh: 2 primery

Forward primer

Reverse primer → celá sekvence „reverse complement“

```
>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATG
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGA
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAGTGAAGGACCTGCGAAGCTTTCAGTATCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGGCTGAACAAAAGAAGCTG
CCGCAGACCTTGTGATATCCAGTCCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCT
TGAGCAGTGTTCATAGGAGAGTTTGGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCTCCG
AAGAAGGCAGTGTCTTCCATCACCAGTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCAC
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGA
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCAGTGTATTTTGCCTCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATCTTAAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTCTGTGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACAGATCAAGCTAGAAAAATGA
```



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

Sequence Manipulation Suite:

Reverse Complement

Reverse Complement converts a DNA sequence into its reverse, complement, or reverse-complement counterpart. Reverse Complement converts a DNA sequence into its reverse, complement, or reverse-complement counterpart. Reverse Complement converts a DNA sequence into its reverse, complement, or reverse-complement counterpart. Reverse Complement converts a DNA sequence into its reverse, complement, or reverse-complement counterpart.

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

```
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCAGTGTATTTGCTCCAAGCAGCCTCTTTGACC
TAAACTTCC
AGGCAGGATCTTAAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCT
TTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCAT
```

Reverse Complement results

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

```
TCATTTCTAGCTTTGATCTGGTTGTCAGTTGGGATGGACTTGCCCAAGTATGGCCAC
AGAAAGGCCAAATTTCTTTTCTCCTCATCTGTACCTCTTTTTCATTAAGAATCC
TGCCCTGGAAGTTTAGTCAAAGAGGCTGCTTGGAGCAAATACAGTGGTGTCTCATCCCA
AATATTTCCAGGCGTTTCTTCCATCCTTCCAGGATTTGAATTCGGGCGTCTGTGGAGT
GTGCCCAATGCTATATGTCAGTTGAGGTTCTAAGACTTGAAGCCACAGAAATGCAGAAT
GCCACTTGAATGGCCAGAGAATGACATTCATGCCCCGGATCCCTTGCAGAGAGTA
CATGGAGCCACTGCCACCAAGTGGTATGGAAGCACTGCCTTCTTACTCCGGAAGGGTCC
TTTGTACATACATGGCAGCGTAAGTGAAGCAAACTCTCTATGAACACTCGCTCAAACA
GCCTTTCAGAATGGCAGGACTCCAAACCACTGCAGGGGAACTGGAATATCACAAGGTC
TGCCGCTTCCAGCTCTTTTGTTCAGCCACAATATCTGGGCTCAGATGGCCTCTTTATA
AGCCAGAACAGACTCGGCAGGATACTGAAAGTTTCGACAGGTCCTTTCAGTTTACCTGTGAT
GTCTTCTGGAAATGATGGGATGAAAGTTCATGGCATAGAGGTCAGTCCACCACCTC
CCATCTTCTTCTTCAAAGCCGCTGCAGCAGCCTCTTTCATGGCATAGTTGAAGGACGT
CCTCTCTGAGTGAGCCAGTACGATCAGTCTTCTGCGGACCAT
```

PCR-amplifikace požadovaného úseku

→ manuální návrh: 2 primery

Forward primer

Reverse 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
CAATCCCATCATTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAACTGAAGGACCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG
CCGCAGACCTTGTGATATCCAGTTCGCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT
TGAGCGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGCTTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCTTCCGGAGT
AAGAAGGCAGTGTTCATCACCACCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCACGGGG
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAAC
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCCTGTATTTTGCCTCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCC
AGGCAGGATCTTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTGTGGG
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

Reverse Complement results

```
>NM_000903.3:122-946 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), transcript variant 1, mRNA reverse complement
TCATTTCTAGCTTTGATCTGGTTGTCAGITGGGATGGACTTGCCCAAGTATGGCCAC
AGAAAGGCCAAATTTCTGTTTTCTCCTCATCCTGTACCTCTTTTTTCATTAAGAATCC
TGCTGGAAGTTTAGGTCAAAGAGGCTGCTTGGAGCAAAATACAGTGGTGTCTCATCCCA
AATATTCAGAGCGTTTCTCCATCCTTCCAGGATTTGAATTCGGGCGTCTGCTGGAGT
GTGCCAATGCTATATGTCAGITGAGGTTCTAAGACTTGGAAAGCCACAGAAATGCAGAA
GCCACTGTAATGGCCAGAGAAATGACATTCATGCCCCGGTGGATCCCTTGACAGAGTA
CATGGAGCCACTGCCACAGTGGTATGGAAGCACTGCCTTCTTACTCCGGAAGGGTCC
TTTGTACATACATGGCAGCGTAAGTGAAGCAAATCTCCTATGAACACTCGCTCAAACCA
GCCTTTCAGAATGGCAGGGACTCCAACCCTGCAAGGGGAACTGGAATATACAAGGTC
TGGGGTTCAGGCTTCTTTGTTTCCAGCCAAATATCTGGGCTCAGATGGCCTTCTTATA
AGCCAGAACAGACTCGGCAGGATACTGAAAGTTCGAGGGTCTTTCAGTTTACCTGTGAT
GTCTTCTGGAATGATGGGATGAAAGTTCATGGCATAGAGGTCAGCTCCACCACTC
CCATCCTTCTTCTTCAAAGCCGCTGCAGCAGCCTCCTTTCATGGCATAGTTGAAGGACGT
CCTCTGAGTGAGCCAGTACGATCAGTGCCTTCTGCGGACCAT
```

PCR-kontrola manuálně navržených primerů: OligoCalc

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

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

Nucleotide base codes

CAG TAT CCT GCC GAG TCT GT

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:
ACA GAC TCG GCA GGA TAC TG

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 **Melting Temperature (T_M) Calculations**

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

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

RlnK cal/(°K*⁴mol) deltaH Kcal/mol
deltaG Kcal/mol deltaS cal/(°K*³mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

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

Check Self-Complementarity

PCR-kontrola manuálně navržených primerů: OligoCalc

→ manuální návrh: 2 primery

Forward primer

Reverse primer

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

```
>NM_000903.2:192-1016 Homo sapiens NAD(P)H quinone dehydrogenase 1  
(NQO1), transcript variant 1, mRNA  
ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGG  
AGGCTGCTGCAGCGGCTTTGAAGAAGAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTT  
CAATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTAAGTGAAGGACCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCC  
GAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAG  
CCGCAGACCTTGTGATATTCAGTTCGCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTT  
TGACGAGTGTTCATAGGAGAGTTTGTCTACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCTTCCGGAGT  
AAGAAGGCAGTGTCTTCCATCACCACCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGCAAGGGATCCAGGGG  
ACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAAC  
TCAACTGACATATAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAA  
CGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCCTGTATTTTGTCCAAGCAGCCTCTTGGACCTAAACTTCC  
AGGCAGGATCTTAATGAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTCTGTGGG  
CCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGA
```

Vyzkoušejte si

1) Manuálně navrhnout primery pro amplifikaci:

3. exonu NQO1 (NM_000903.3)

- délka:18-24nt

- T_m: 55-60°C

Vyzkoušejte si

1) Manuálně navrhnout primery pro amplifikaci:

3. exonu NQO1 (NM_000903.3)

```
241 ggacctctat gccatgaact tcaatcccat catttccaga aaggacatca caggtaaact
301 gaaggaccct gcgaactttc agtatcctgc cgagtctggt ctggcttata aagaaggcca
361 tctgagcca gatattgtgg ctgaacaaaa gaagctggaa gccgcagacc ttgtgatatt
421
```

- délka:18-24nt

- Tm: 55-60°C

Výsledek:

```
R:CTG GAA TAT CAC AAG GTC TGC (59,5°C)
F:GTA AAC TGA AGG ACC CTG CG (60,5°C)
```


Vyzkoušejte si

1) Manuálně navrhnout primery pro amplifikaci:

3. exonu NQO1 (NM_000903.3)

```
241 ggacctctat gccatgaact tcaatcccat catttccaga aaggacatca caggtaaact
301 gaaggaccct gcgaactttc agtatcctgc cgagtctggt ctggcttata aagaaggcca
361 tctgagccca gatattgtgg ctgaacaaaa gaagctggaa gccgcagacc ttgtgatatt
421
```

- délka:18-24nt

- Tm: 55-60°C

Výsledek:

Vyzkoušejte si

1) Manuálně navrhnout primery pro amplifikaci:

3. exonu NQO1 (NM_000903.3)

- délka:18-24nt

- Tm: 55-60°C

Výsledek: **F:** GTA AAC TGA AGG ACC CTG CG 60°C
R: CTG GAA TAT CAC AAG GTC TGC 60°C

2) zkontrolujte pozice pomocí multalin:

(porovnejte) celou mRNA, 3. exon a oba primery

porovnání - multalin

>3.exon
GTA AACT GAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAG
GAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCG
>NM_000903.3
ACACGCGACTCCCACAAGGTTGCAGCCGGAGCCGCCAGCT
CCCCGGCAACCCAGCCAAACATCAGCCCGCCGACTG

>F
GTA AAC TGA AGG ACC CTG C |
>3.exon
GTA AACT GAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCT
GAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATCCAG
>NM_000903.3
ACACGCGACTCCCACA
CCCCGGCAACCCAGAG
TGATCGTACTGGCTCA
GAAGAAGAAAGGATGG

1 10 20 30 40 50

3.exon
NM_000903.3
ACACGCGACTCCCACAAGGTTGCAGCCGGAGCCGCCAGCTCCACGAGGCTTAGTT
Consensus

131 140 150 160 170 180

3.exon
NM_000903.3
AGAGAGCAGCTGATCGTACTGGCTCAGTAGGAGGAGGCTCCTTCACTATGCCATGAGAGGAGCTGCGAGCGCTTGTAGAG
Consensus

261 270 280 290 300 310 320 330 340

3.exon
NM_000903.3
TCATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTA AACT GAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATCCAG
Consensus

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

3.exon
NM_000903.3
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
Consensus

521 530 540 550 560 570 580

3.exon
NM_000903.3
G A C A A A G G A C C C T T C C G A G T A A G A G G C A G T G C T T C C A T C A C C A C T G G T G G C A G T G G C T
Consensus

651 660 670 680 690 700 710

3.exon
Consensus

1431 1440 1450

R
F
3.exon
NM_000903.3
Consensus

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

F
3.exon
NM_000903.3
TCATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTA AACT GAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATCCAG
Consensus

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

F
3.exon
NM_000903.3
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
g a a g
Consensus

>R_rc
CAG ACC TTG TGA TAT TCC AG
>F
GTA AAC TGA AGG ACC CTG C
>3.exon

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

R_rc
3.exon
NM_000903.3
TCATCCCATCATTTCCAGAAAGGACATCACAGGTA AACT GAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATCCAG
Consensus

391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

R_rc
3.exon
NM_000903.3
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
G A A G C T G G A A G C C G C A G A C C T T G T G A T A T T C C A G
F
Consensus

.....cagaccttgtgatattccag.....

CTGGATATCACAGGTCG

.....c.g.a...c.c.ggtc.g.....

porovnání - multalin

```

>R_rc
CAG ACC TTG TGA TAT TCC AG
>F
GTA AAC TGA AGG ACC CTG C
>3.exon
GTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCT
GAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAG
>NM_000903.3
ACACGCGACTCCACAAAGGTTGCAGCCGGAGCCGCCAGCTCACCGAGAGCCTAGTTCGGCCAGGGTCTG
CCCCGGCAACCACGAGCCCAGCCAATCAGCGCCCCGGACTGCACCAGAGCCATGGTCGGCAGAAGAGCAC
    
```

Pro porovnání nutné R primer vložit jako „reverse complement“

	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
R_rc	-----														
3.exon	-----														
NM_000903.3	TCAATCCCATCATTTCAGAAAGGACATCACAG	GTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAG										GTAAACTGAAGGACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAG			
F	-----														
Consensus	-----														
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
R_rc	-----														
3.exon	-----														
NM_000903.3	GAGCTGGAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAG														
F	GAGCTGGAGCCGCAGACCTTGTGATATTCCAG														
Consensus	-----														

Consensus	-----														
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	
R	-----														
F	-----														
3.exon	-----														
NM_000903.3	TCAATTACAAGCAGTTACTAATATGCCTAGCAC	CTGGATATCACAGGCTCTG										AGCTTTTGTGTTTATATACAGTACACAGATACCTTGAAGGAAGAGCTAATAATCTCTCTTTGCTGCAGTCATCTA			
Consensus	-----														



Vyzkoušejte si (DU7)

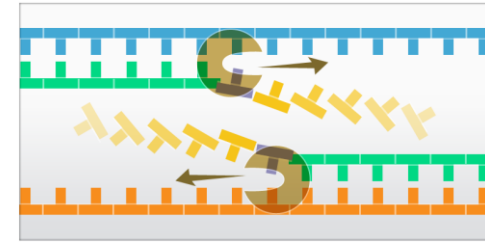
Manuálně navrhnout primery pro vaši **CDS** (kódující sekvenci).

- délka:18-24nt
- T_m: 55-60°C

+ zkontrolujte pozice pomocí multalin:

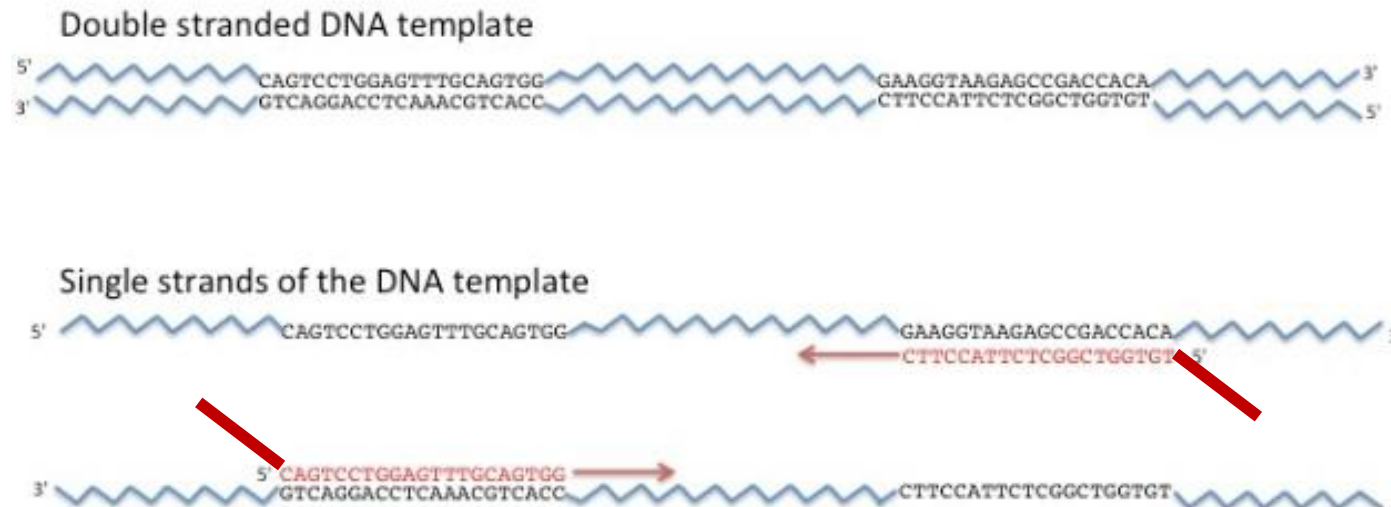
(porovnejte) celou mRNA, CDS a oba primery

Polymerázová řetězová reakce



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

→ manuální návrh



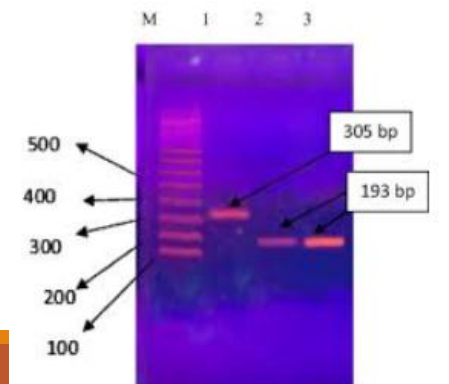
Polymerázová řetězová reakce

2) Detekce vybraného genu

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

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:

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

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]

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

Or, upload FASTA file

Range

Forward primer [Clear](#)

Reverse primer

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
<input type="text" value="70"/>	<input type="text" value="1000"/>

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min	Opt	Max	Max T_m difference
<input type="text" value="57.0"/>	<input type="text" value="60.0"/>	<input type="text" value="63.0"/>	<input type="text" value="3"/>

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
<input type="text" value="7"/>	<input type="text" value="4"/>

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	To	Clear
	196		
Reverse primer		1016	

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
200	500

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min	Opt	Max	Max T _m difference
57.0	60.0	63.0	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.

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)

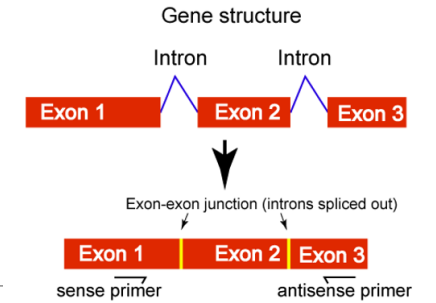
Get Primers Show results in a new window Use new graphic view

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 DU7-2.část**

DÚ7 – Návrh primerů

1) Navrhněte primery, tak aby se amplifikovala vaše CDS

- Navrhněte F a R primer tak aby T_m nebyla větší než 60°C
- zkontrolujte pozice pomocí multalin:
(porovnejte) celou mRNA, CDS a oba primery

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

DÚ7 – Návrh primerů - řešení

1) F: ATG GTC GGC AGA AGA GCA C
R: TCA TTT TCT AGC TTT GAT CTG GT

2) navrhěte primery pro DETEKCI vašeho genu