

1. SEKVENAČNÍ ANALÝZA A DETEKCE BODOVÉ MUTACE GENU *SOD1* U PSA

Cíl úlohy

U plemene Bernský salašnický pes se vyskytuje substituční mutace *SOD1:c.52A>T* vedoucí k onemocnění degenerativní myelopatie. Toto onemocnění se vyskytuje pouze u zvířat, která nesou obě mutované alely (T/T). Cílem této komplexní úlohy je naučit se pracovat s hrubými sekvenačními daty, které jsou výstupem amplikonové dideoxy - sekvenace. Provedte očištění hrubých sekvenačních dat od počátečních a koncových nekvalitních oblastí. Stanovte konsensus sekvence při sekvenování od obou primerů. Složte výslednou konsensus sekvenci oblasti s výskytem kauzálního SNP. Ověřte výsledek sekvenace s celogenomickými daty bioinformatické databáze NCBI. Identifikujte sekvenační primery v získané sekvenci. Navrhněte další primerový pár, který bude amplifikovat menší oblast lemující kauzální SNP. Ověřte specifičnost nově navržených primerů bioinformatickou analýzou. Provedte restriční analýzu s cílem identifikovat restriční endonukleázy s potenciálem odlišit nemutovanou a mutovanou alelickou variantu genu *SOD1*. Navrhněte finální kodominantní PCR-RFLP marker schopný jednoznačně odlišit všechny 3 alelické kombinace genu *SOD1*.

Vstupní data

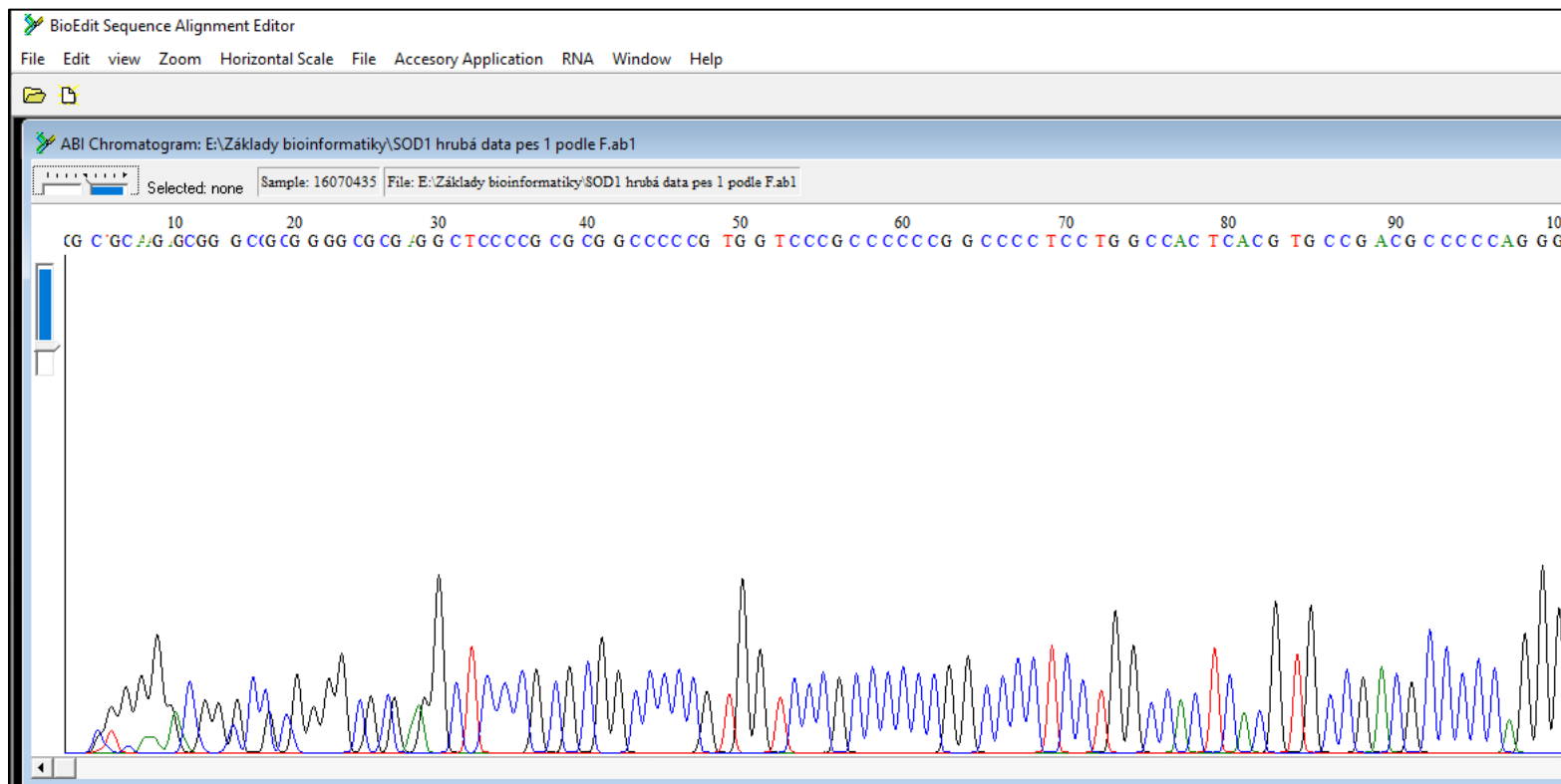
- Sekvence ve formátu ABI a FASTA, které jsou přiloženy k této úloze. Sekvence představují vlákna s orientací 5'-3'.

Potřebné bioinformatické nástroje

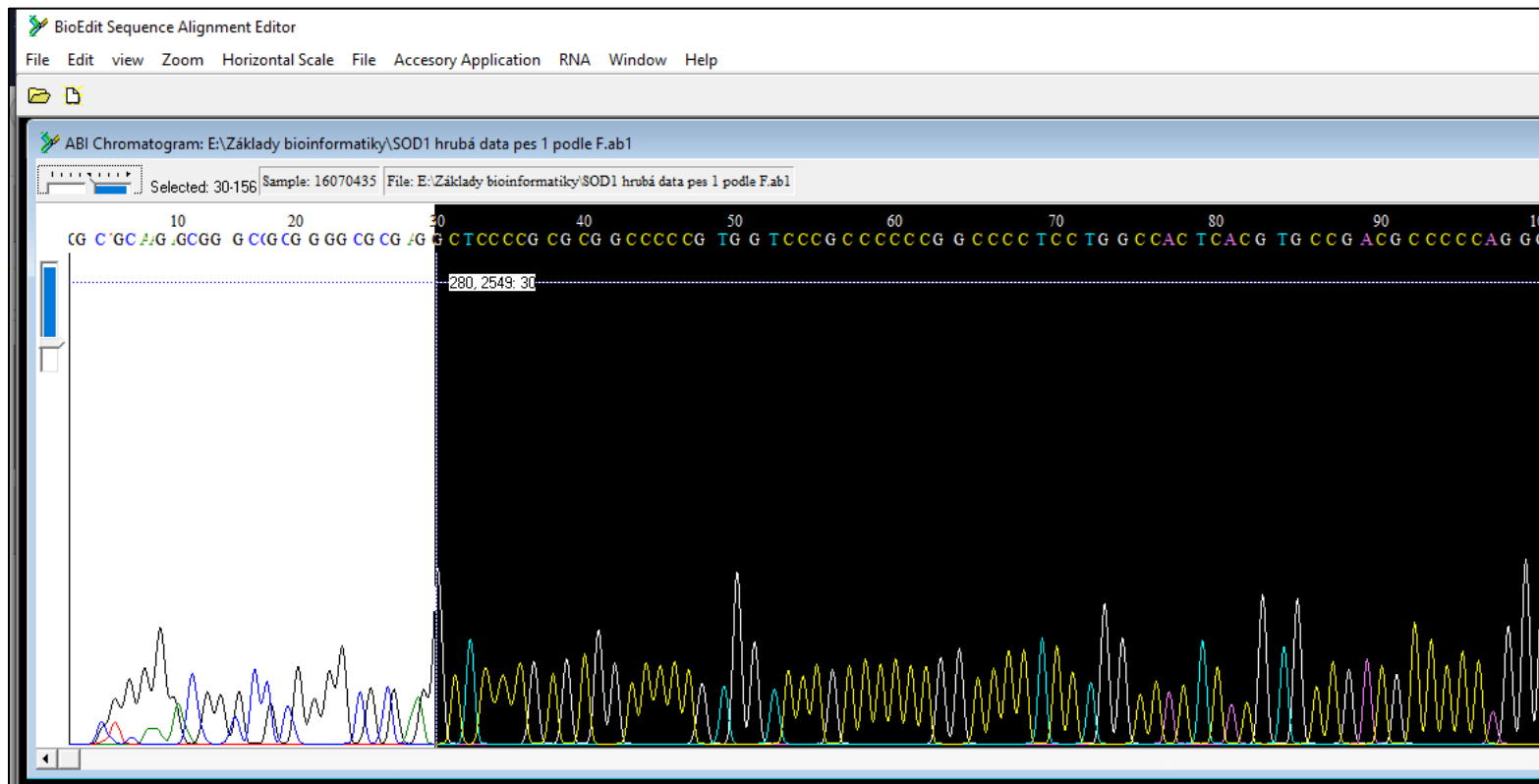
- BioEdit 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>)
- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)
- Primer3 (v. 0.4.0) (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)
- Reverse Complement (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)
- Web BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Návod na řešení úlohy

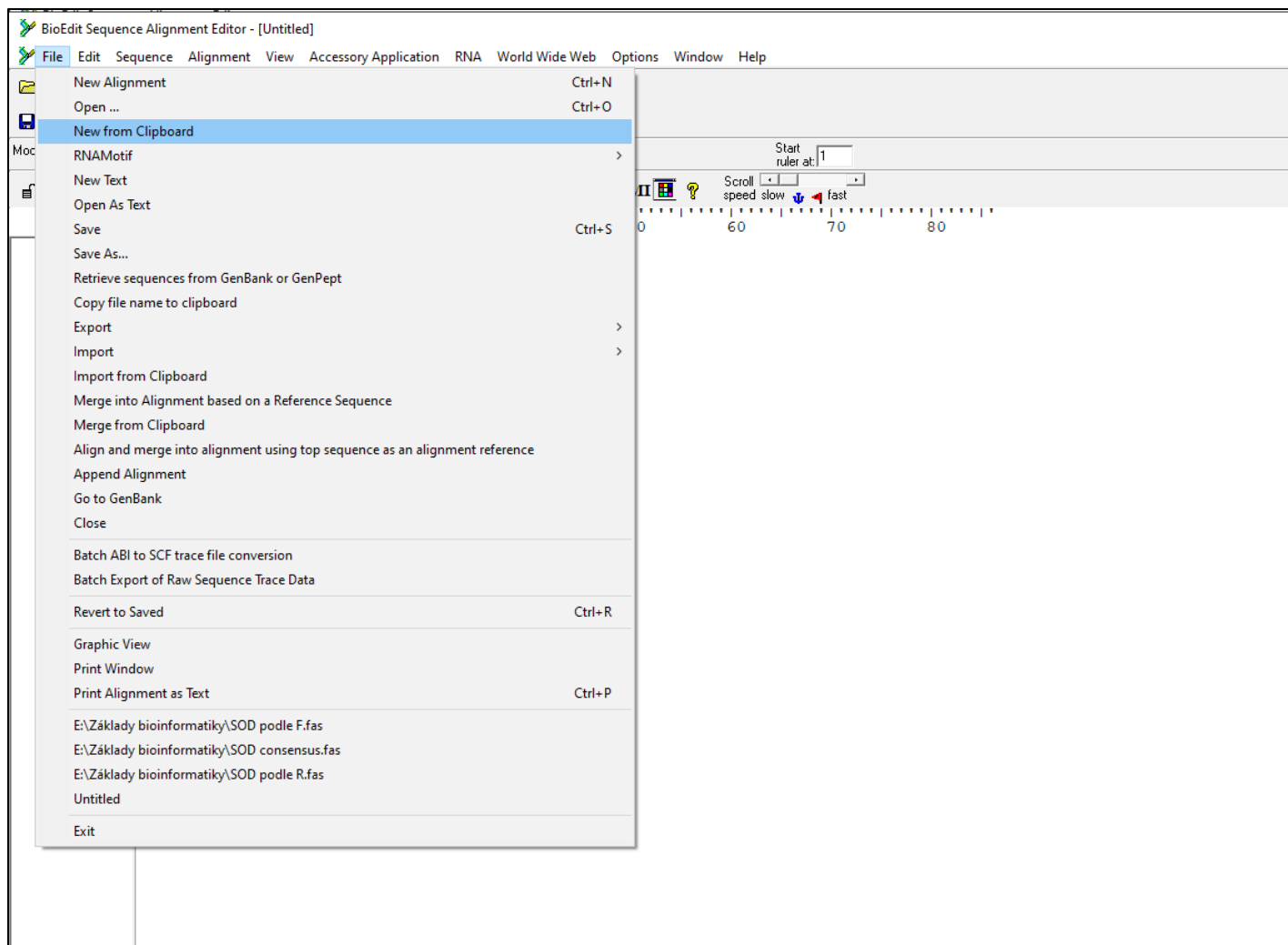
1. Pomocí programu BioEdit otevřete hrubá sekvenční data. Sekvence byla provedena u 3 psů s příznaky onemocnění, a to vždy od F i R primeru. Z obrázku je patrné, že začátek i konec sekvenace obsahuje nekvalitní píky, které pro analýzu nelze použít.



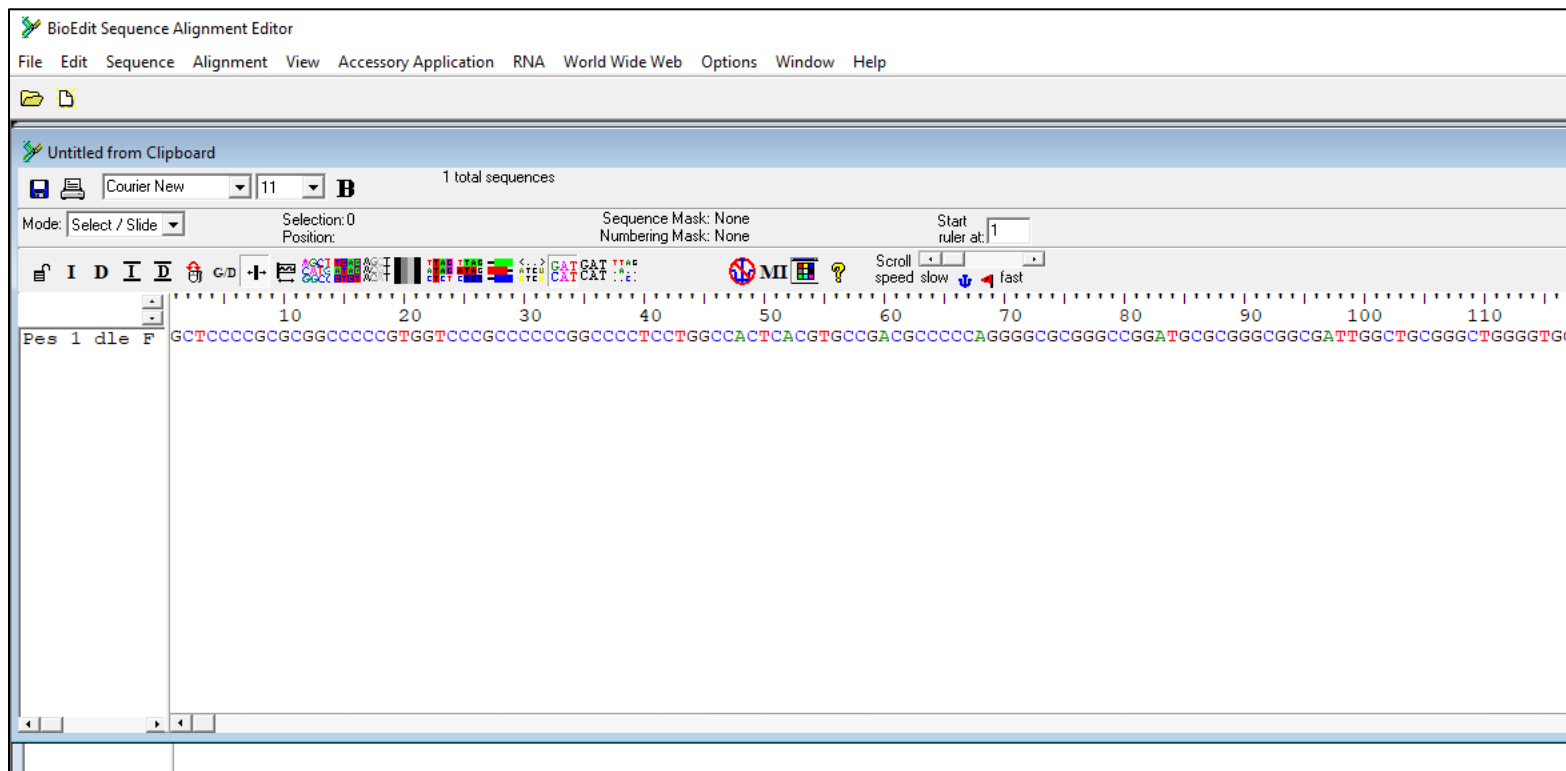
2. Proto je nezbytné každou získanou sekvenci ošetřit tak, aby neobsahovala tato nekvalitní data. Jedná se přibližně o 20 – 30 prvních a posledních nukleotidů. Pomoci myši vyznačte kvalitní část sekvence a zkopírujte ji do schránky.



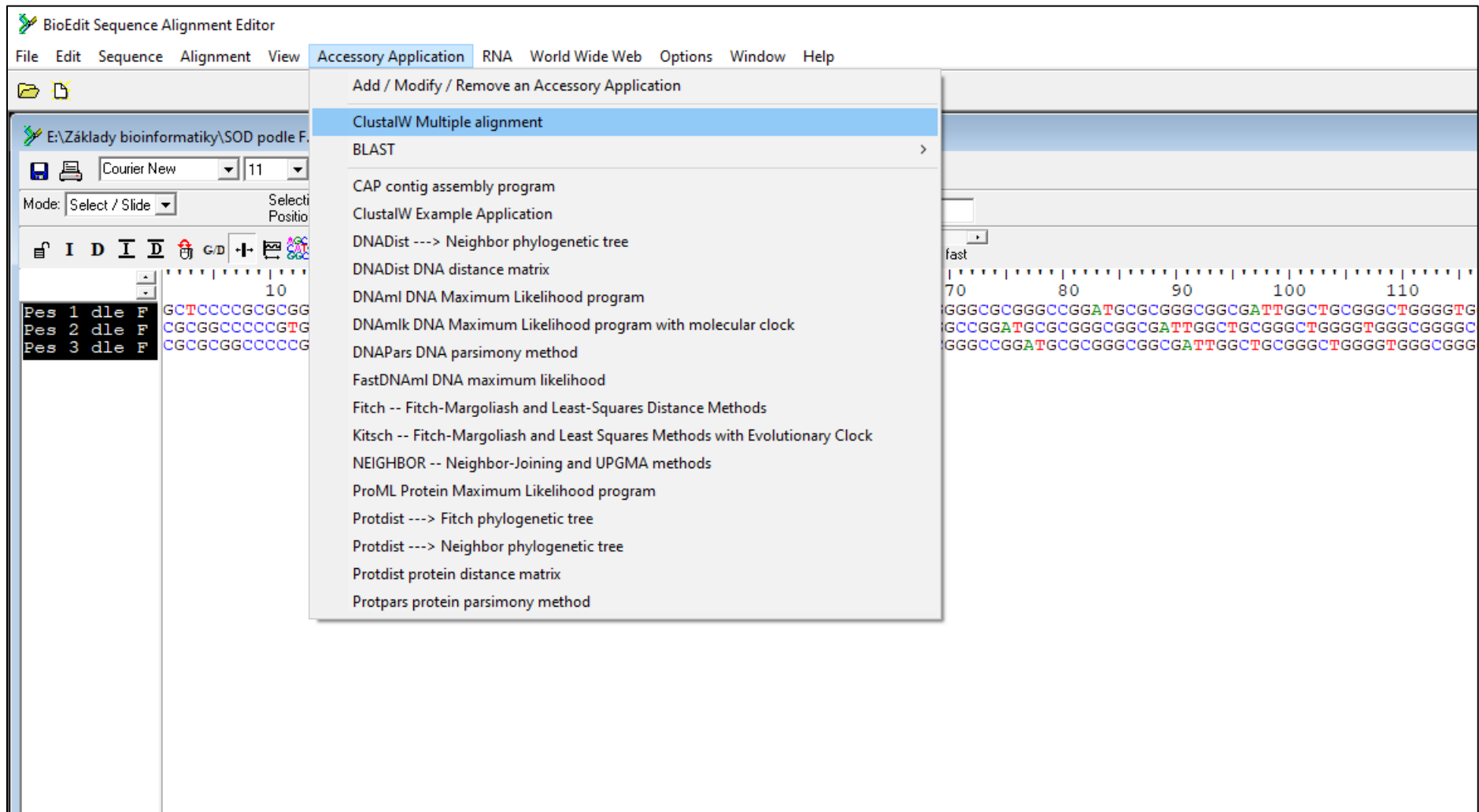
3. V nabídce Edit zvolte funkci New from Clipboard. Program automaticky vytvoří nový soubor s kopírovanou sekvencí.



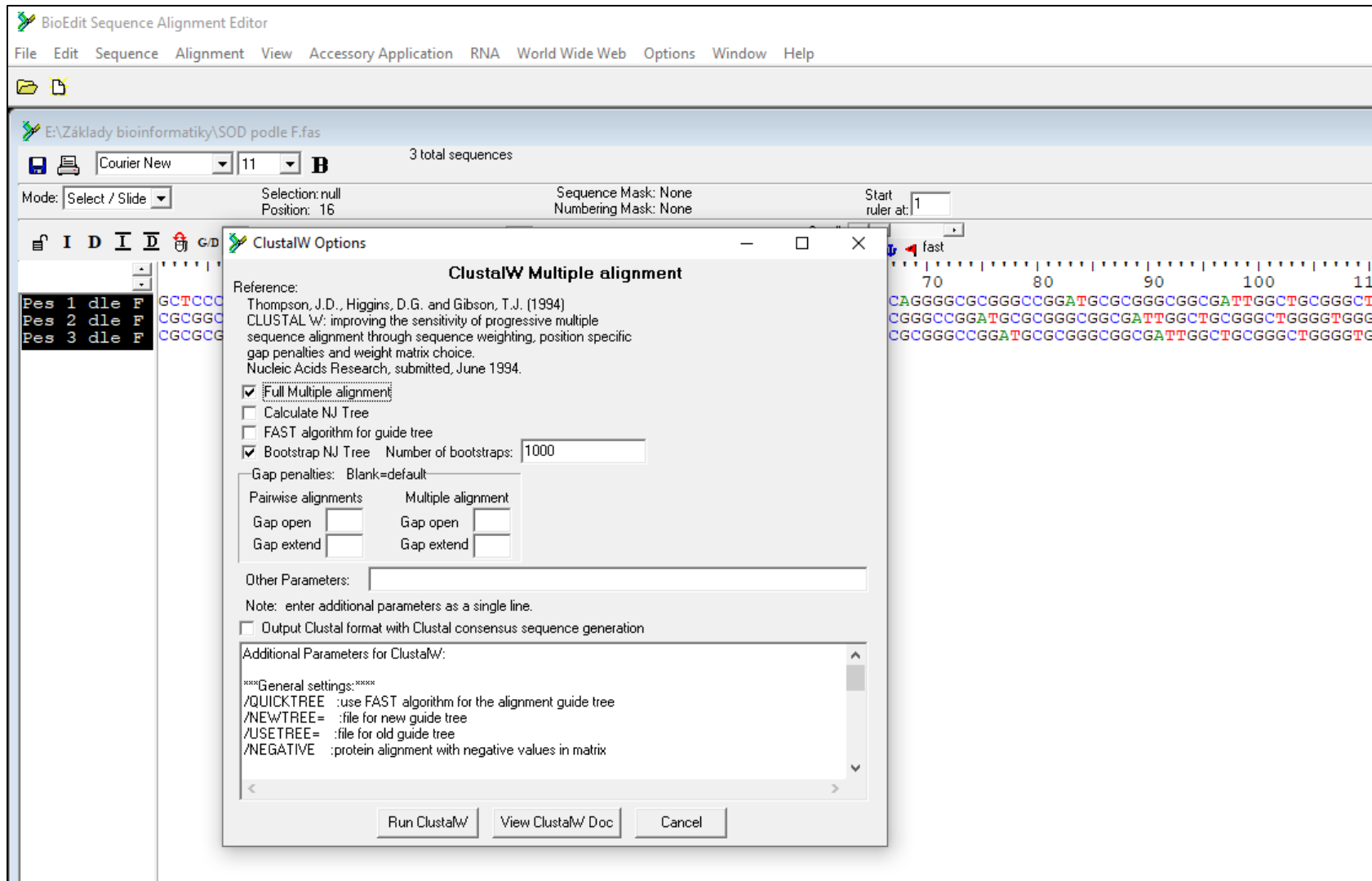
4. Sekvenci si pojmenujte, aby z názvu bylo patrné číslo hodnoceného jedince a směr sekvence. Shodným způsobem do tohoto souboru postupně přidejte sekvence zbývajících dvou psů. Vytvořený soubor si pojmenujte a uložte ve formátu FASTA do svého počítače. Shodným souborem vytvořte druhý soubor, ve kterém se budou nacházet reprezentativní sekvence získané od R primeru.



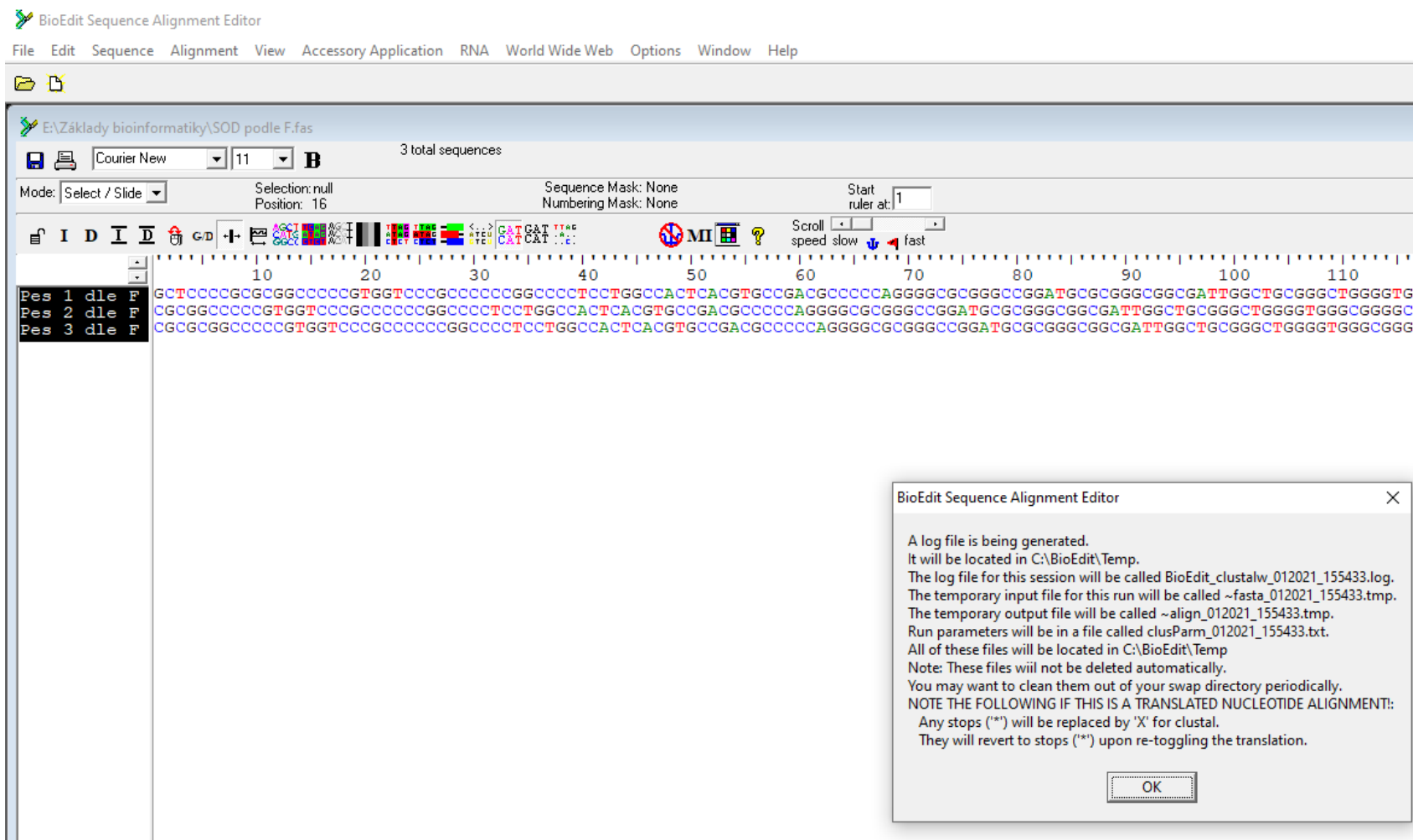
5. Dalším krokem analýzy je porovnání sekvencí 3 jedinců pomocí algoritmu ClustalW Multiple Alignment, který je součástí nabídky Accessory Application. Před spuštěním tohoto algoritmu je nezbytné myší vybrat všechny 3 porovnávané sekvence.



6. Pro vlastní srovnávací analýzu ponechte nastavené všechny implicitně nastavené parametry.



7. Rovněž vlastní spuštění analýzy probíhá podle implicitního nastavení. Algoritmus ClustalW aplikujte rovněž i na 3 sekvence získané sekvenací od R primeru. Výstupy algoritmu ClustalW uložte do samostatných souborů a pojmenujte je tak, aby bylo patrné, že se jedná o již vzájemně porovnané sekvence.



The screenshot shows the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The main window displays three DNA sequences (Pes 1, Pes 2, Pes 3) aligned. The sequences are:

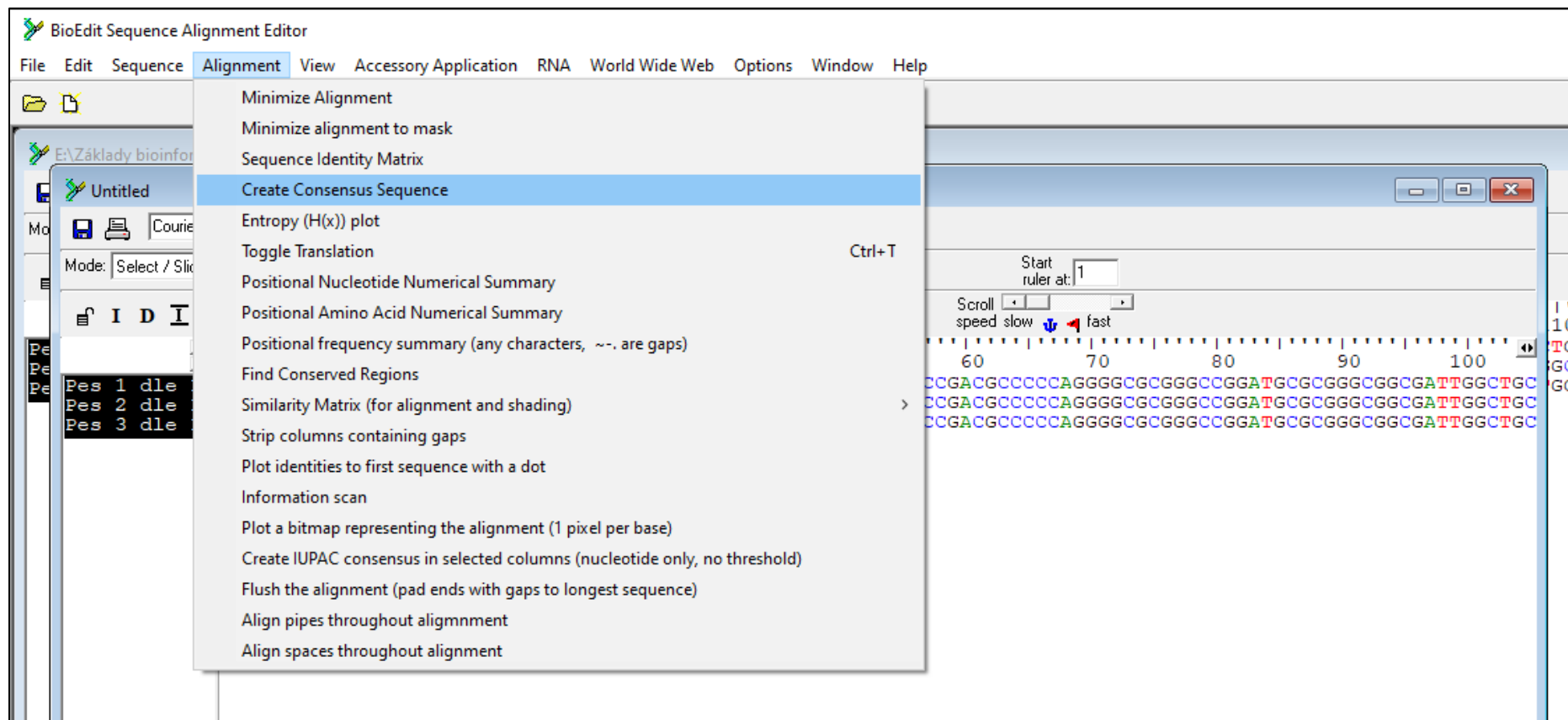
```
Pes 1 dle F GCTCCCCGCGCGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGGCCCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACGCCGCCAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGGCATTTGGCTGCGGGCTGGGGTG
Pes 2 dle F CGCGGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGGCCCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACGCCGCCAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGGCATTTGGCTGCGGGCTGGGGTG
Pes 3 dle F CGCGGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGGCCCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACGCCGCCAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGGCATTTGGCTGCGGGCTGGGGTG
```

A dialog box titled "BioEdit Sequence Alignment Editor" is open in the foreground, displaying the following text:

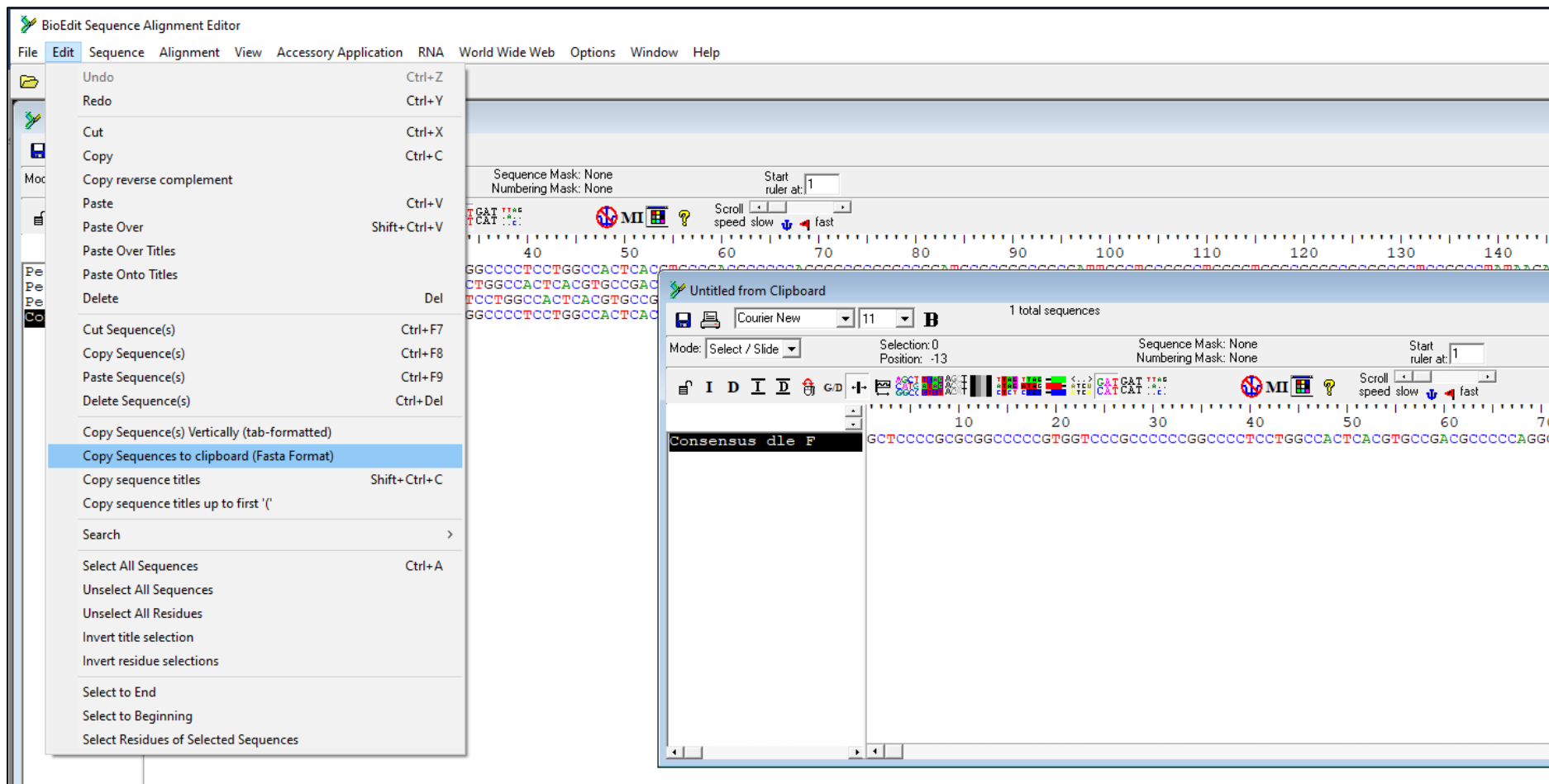
A log file is being generated.
It will be located in C:\BioEdit\Temp.
The log file for this session will be called BioEdit_clustalw_012021_155433.log.
The temporary input file for this run will be called ~fasta_012021_155433.tmp.
The temporary output file will be called ~align_012021_155433.tmp.
Run parameters will be in a file called clusParm_012021_155433.txt.
All of these files will be located in C:\BioEdit\Temp
Note: These files will not be deleted automatically.
You may want to clean them out of your swap directory periodically.
NOTE THE FOLLOWING IF THIS IS A TRANSLATED NUCLEOTIDE ALIGNMENT:
Any stops (***) will be replaced by 'X' for clustal.
They will revert to stops (***) upon re-toggling the translation.

OK

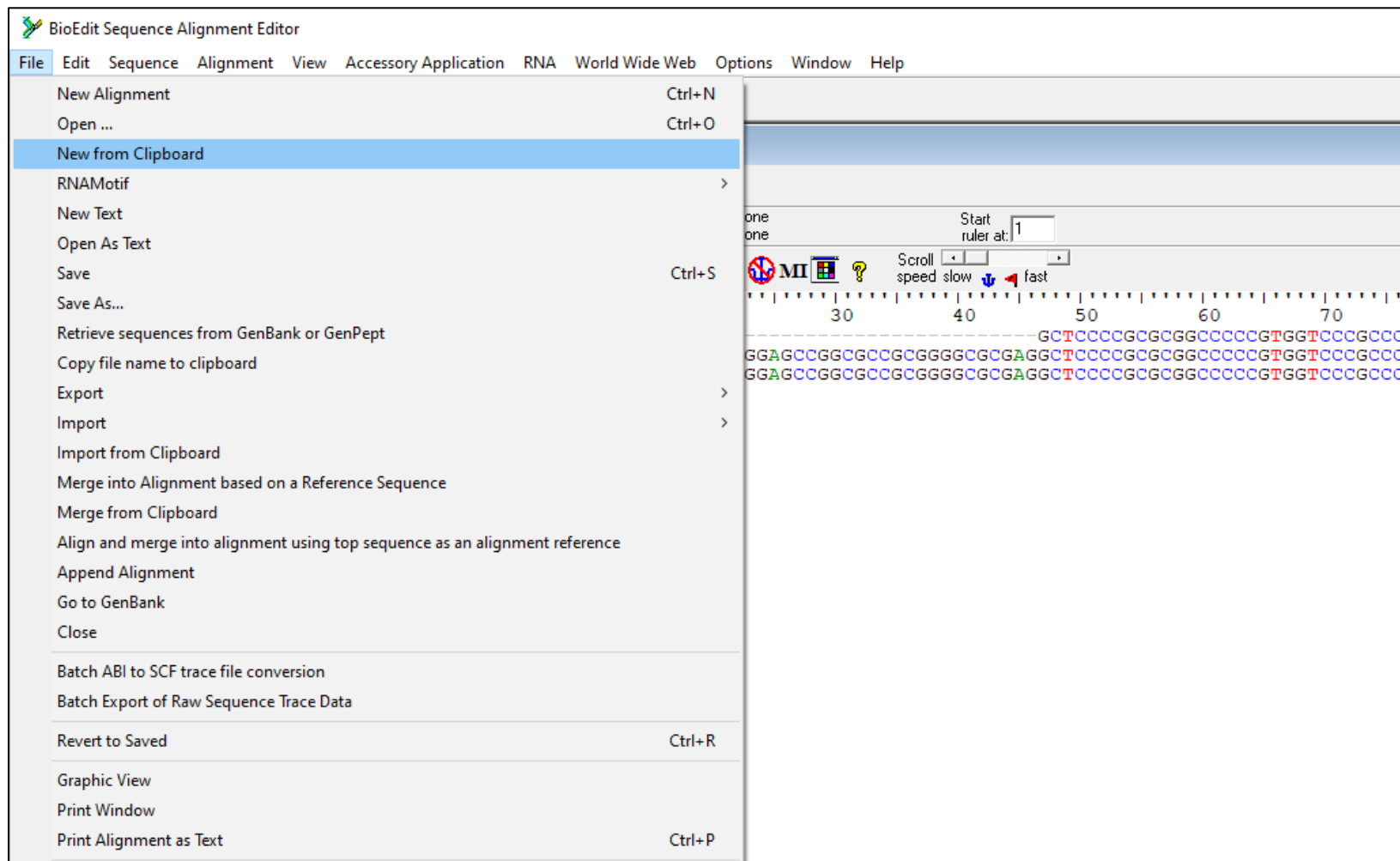
8. Pro následující kroky analýzy budeme předpokládat, že 3 hodnocení jedinci nebudou vykazovat žádné SNP v sekvenovaných amplikonech. Jelikož se délky reprezentativních sekvencí mohou mezi hodnocenými jedinci mírně lišit, přistoupíme k vytvoření konsensus sekvence. Vyberte 3 reprezentativní sekvence (psi 1-3) získané podle F primeru. Označte je a v nabídce Alignment vyberte funkci Create Consensus Sequence. Stejnou operaci proveďte rovněž i pro sekvenační data získané podle R primeru.



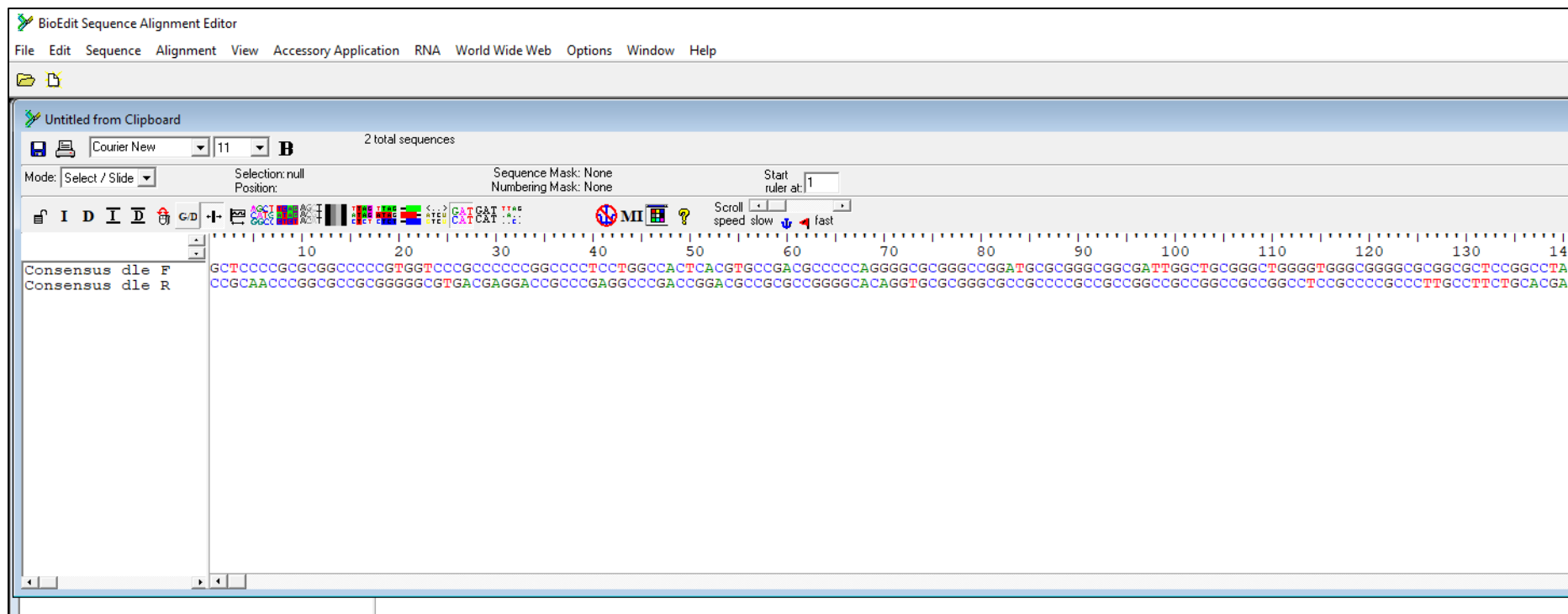
10. Nyní přejmenujte obě konsensus sekvence tak, aby bylo patrné, zdali vznikly na základě sekvenace podle F nebo R primeru. Dalším krokem je vytvoření souboru, ve kterém budou pouze tyto dvě konsensus sekvence. Postupujte následovně. Označte si například konsensus sekvenci podle F primeru a v nabídce Edit zvolte možnost Copy Sequences to Clipboard (FASTA format).



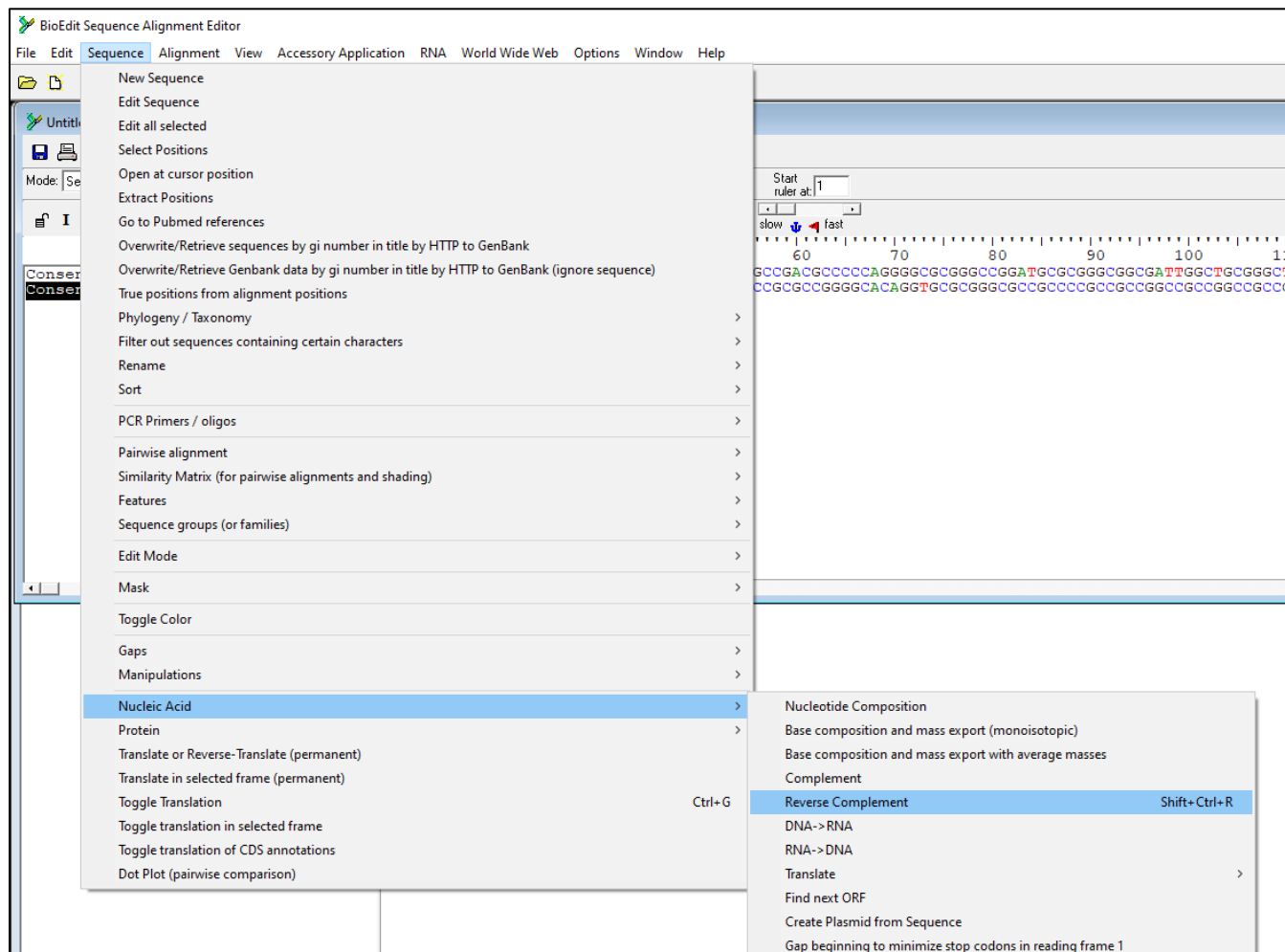
11. Nyní založte nový soubor a to pomocí funkce New from Clipboard. Do nového souboru se nahraje konsensus sekvence od primeru F. Stejným způsobem si uložíte do schránky ve formátu FASTA konsensus sekvenci vytvořenou podle sekvenace podle primeru R. Pro její vložení použijte funkci Import from Clipboard.



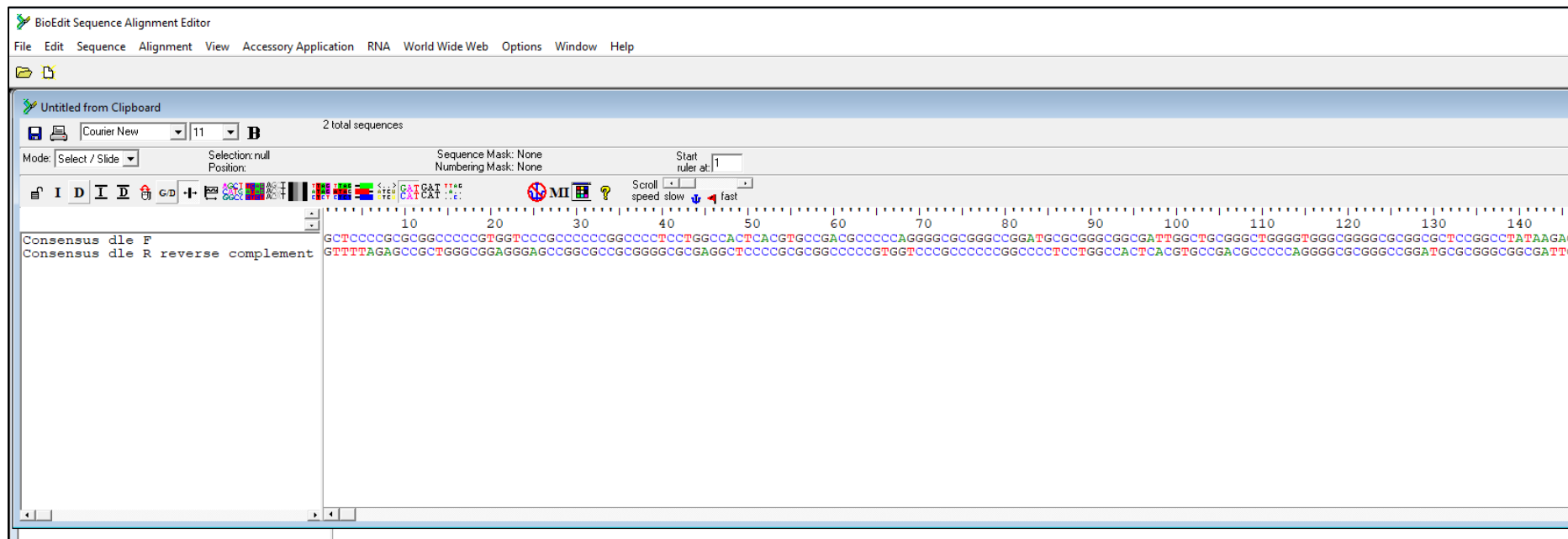
12. Nyní máte v souboru uloženy obě konsensus sekvence, ze kterých je možné složit sekvenci celého fragmentu genu *SOD1*. Je potřeba si uvědomit, že konsensus sekvence získaná podle F primeru představuje sekvenci vlákna s orientací 5'-3'. Jedná se v podstatě o vlákno uložené v databázi NCBI. Konsensus sekvence podle R primeru je rovněž orientovaná ve směru 5'-3', ale představuje sekvenci, která je ke konsensus sekvenci podle F primeru komplementární.



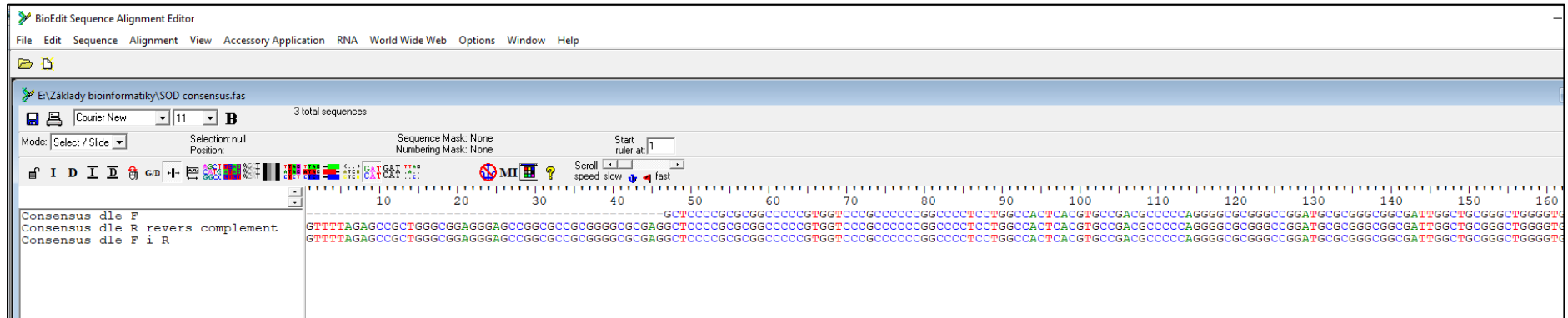
13. Proto, aby bylo možné obě konsensus sekvence porovnat a vytvořit finální konsensus sekvenci, je nutné podle konsensus sekvence podle R primeru vytvořit sekvenci reverzně komplementární. Pomocí myši vyberte konsensus sekvenci podle R primeru. Vyberte funkce Sequence – Nucleic Acid – Reverse Complement.



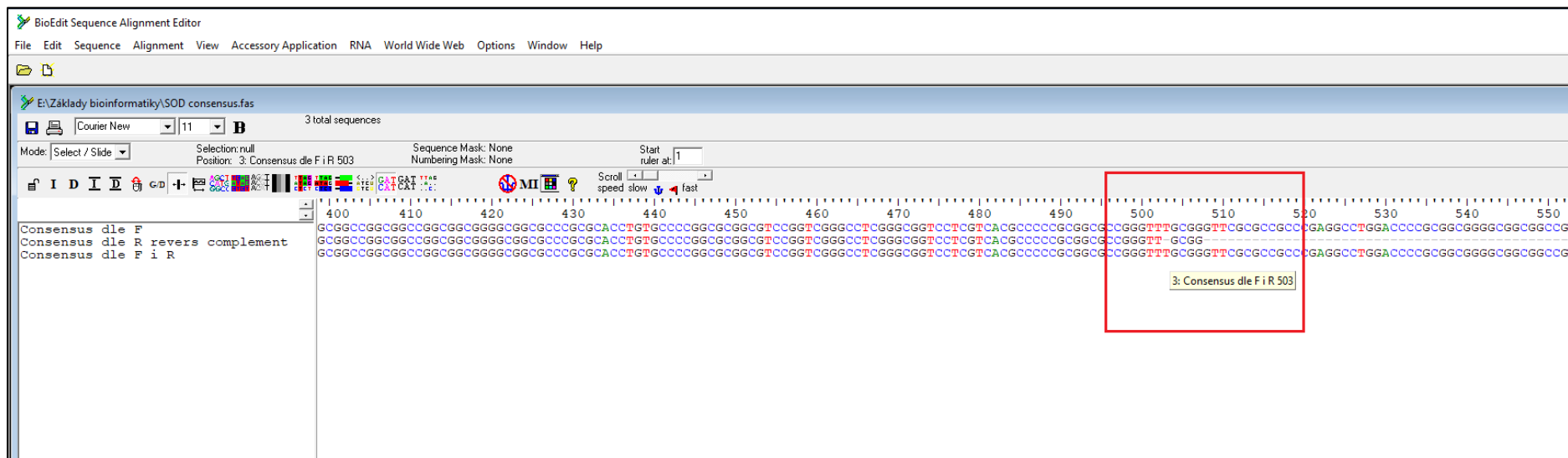
14. V souboru dojde ke změně konsensus sekvence podle R primeru na sekvenci k ní reverzně komplementární. Provedte přejmenování této sekvence tak, aby z názvu bylo patrné, že se jedná o reverzně komplementární sekvenci.



15. Nyní je možné obě sekvence porovnat pomocí algoritmů, které byly popsány v předchozí části úlohy (Accessory Application – ClustalW Multiple Alignment) a vytvořit finální konsensus sekvenci (Alignment – Create Consensus Sequence).



16. Závěrečným krokem skládání sekvenovaných PCR amplikonů je manuální vyhodnocení potenciálně se vyskytujících sekvenčních rozdílů ve skládaných konsensus sekvencích. V zadané úloze byla nalezena jedna neshoda. Jedná se o přítomnost T v pozici 503. nukleotidu finální konsensus sekvence dle F i R.



17. Na základě porovnání vstupních 6 chromatogramů (hrubá sekvenční data) je patrná jejich lepší čitelnost v oblasti 3'konců při sekvenování od F primeru. Proto provedeme manuální překontrolování pořadí nukleotidů. Z následujícího obrázku je zřetelné, že sekvence obsahuje skutečně nukleotidy TTT a výsledná konsensus sekvence byla složena správně.

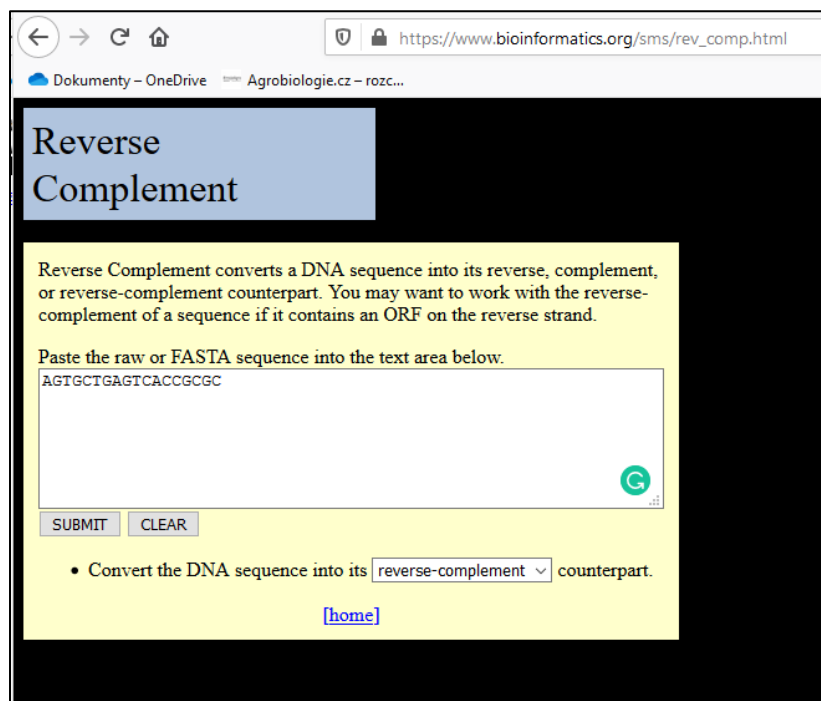


18. Pokud byla vlastní sekvenace provedena kvalitně, jinými slovy pokud byly koncové špatně čitelné oblasti krátké, je možné ve finální konsensus sekvenci identifikovat primery použité pro PCR amplifikaci sekvenovaného fragmentu DNA. Sekvenační primery měly následující sekvenci:

SEQ F: 5' GTTTCTGGGCGTTTTAGAGC 3'

SEQ R: 5' AGTGCTGAGTCACCGCGC 3'

Pro identifikaci R primeru ve finální consensus sekvenci je nezbytné získat reverzně komplementární sekvenci R primeru například pomocí aplikace Reverse Complement (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)



Reverse complement SEQ R: 5' GCGCGGTGACTCAGCACT 3'

19. V programu BioEdit zkopírujte finální konsensus sekvenci ve formátu FASTA do schránky a následně jí vložte do nového souboru programu Word (MS Office). Do stejného souboru vložte i sekvence sekvenačních primerů a proveďte manuální vyhledání primerů, respektive jejich částí v získané finální konsensus sekvenci.

SEQ F: 5' GTTCTGGGC **GTTTAGAGC** 3'

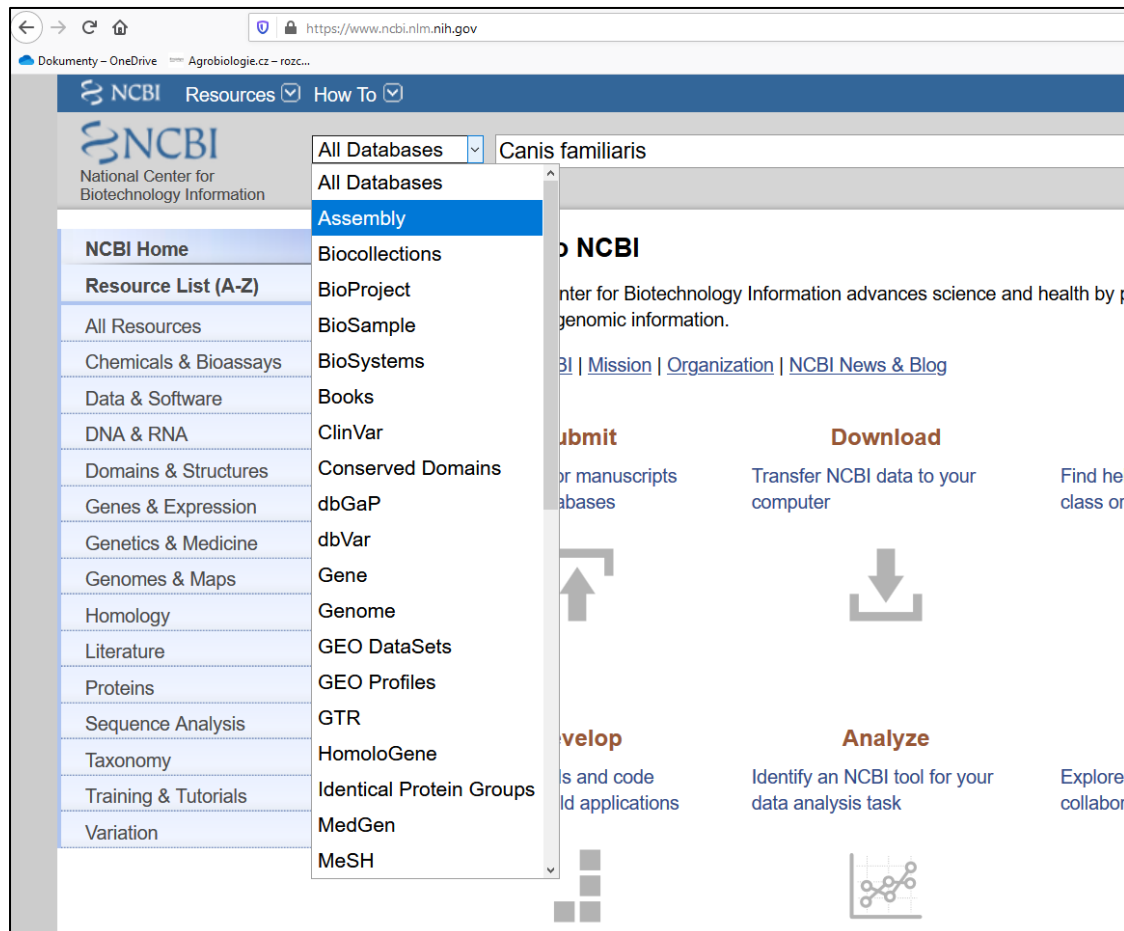
Reverse complement SEQ R: 5' **GCGCG**GTGACTCAGCACT 3'

>Consensus dle F i R

GTTTAGAGCCGCTGGGCGGAGGGAGCCGGCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGCCCCGTGGTCCCGCCCCGGCCCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACG
CCCCAGGGGCGCGGGCCGATGCGCGGGCGGCGATTGGCTGCGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGCGCTCCGGCCTATAAGAGCGCGGGCGCGCCCGCCTCGGTT
TGCCTCGGCGTCTGCTGCGGCGTCCCGCTGCCCTCGACTGCTGCAGCCGTCGGAGCCCGGCCGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGT
GCGTGTGAAGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGCTCCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGGGCGGAGGCCGGCGGCCGGCGGGGCGGCGCCCCG
CGCACCTGTGCCCCGGCGGCGGTCCGGTCCGGCCTCGGGCGGTCTCGTACGCCCCCGGGCGCCGGTTTTCGGGTTTCGCGCCCGCCGAGGCCTGGACCCCGCGGC
GGGGCGGCGGCCGAGTGCTGAGTACC **GCGC**

Z výše uvedené konsensus sekvence podle F i R je patrné, že v ní byly identifikovány pouze části sekvenačních primerů, což bylo způsobeno tím, že do analýzy nebyly zahrnuty nekvalitní počáteční a koncové oblasti hrubých sekvenačních dat

20. Vzhledem k tomu, že pes domácí je zoologický druh, jehož genom byl opakovaně sekvenován technikami NGS. Je možné správnost sekvenace vyhodnotit na základě porovnání námi získané sekvence s údaji mezinárodní biotechnologické databáze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Při vyhledávání zadejte druhové jméno *Canis familiaris* a vyberte databázi Assembly.



21. V databázi bude vyhledán aktuální referenční genom (ROS_Cfam_1.0). Jedná se o sekvenci genu psa plemene labradorský retrív, který nenesé námi studovaný SNP a představuje tudíž původní nemutovanou (wild) alelu genu *SOD1*.

The screenshot shows the NCBI search results for the query 'Canis familiaris'. The search was performed on the NCBI website, and the results are displayed in a structured format. The main result is the 'ROS_Cfam_1.0' genome assembly, which is a reference sequence for the dog genome. The assembly was generated by The Roslin Institute in September 2020 and is available in the RefSeq database (GCF_014441545.1). The search results also include a section for 'Assembly statistics' and two columns of related data: 'Literature' and 'Genes'. The 'Literature' column lists various databases and the number of records found in each, while the 'Genes' column lists various databases and the number of records found in each.

Search NCBI

Results found in 27 databases (1 error)

GENOME ASSEMBLY Was this helpful?

ROS_Cfam_1.0
Canis lupus familiaris (dog)
The Roslin Institute (September 2020)
RefSeq GCF_014441545.1

[Genome Browser](#) [BLAST](#) [Get data](#)

Assembly statistics +

Literature	
Bookshelf	4,210
MeSH	23
NLM Catalog	1,564
PubMed	347,753
PubMed Central	186,112

Genes	
Gene	50,917
GEO DataSets	14,784
GEO Profiles	205,497
HomoloGene	17,434
PopSet	536

22. Zvolte funkci BLAST a do vyhledávacího okna zadejte námi získanou finální konsensus sekvenci. Vyberte parametry vyhledávání podle nastavení, které je uvedeno na následujícím obrázku.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&SEARCH_INIT=ReprGenomeDBSearch&TAXID=9615

Dokumenty – OneDrive Agrobiologie.cz – rozc...

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information

BLAST » blastn suite

Canis lupus familiaris (dog) Nucleotide BLAST

blastn blasto blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange [From](#) [To](#)

```
>Consensus dle F i R
GTTTATAGACCGCTGGGCGAGGAGCCGCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCGCGCGGCC
CCGTGGTCCCGCCCGCCGCTCTGCGCACTACAGTGGCGAGCGCCCGAGGGCGCGGG
CCGGATGCGGGGCGCGATGGCTGCGGGCTGGGGTGGGGGCGCGCGCTCCGGGCTA
TAAGAGCGCGGGGCGCGCCGCTGGGTTGGCTGGCGTCTGCTGCGGGCTCTCCGCTGC
CCTCGGACTGCTGAGCCGTCGGAGCCCGCCGAGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCAIGGA
```

Or, upload file Soubor nevybrán.

Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search

Choose Search Set

Database

Exclude Models (XM/XP)

Optional Entrez Query
Optional Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for

- Highly similar sequences (megablast)
- More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
- Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Genome (ROS_Cfam_1.0 reference, Annotation Release 106) - *Canis lupus familiaris* using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window

[Algorithm parameters](#)

23. Vyhledávací funkce BLAST identifikovala 99,82% sekvenční shodu s oblastí 31. chromozómu

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST » blastn suite » results for RID-0K308KH7013

Home Recent Results Saved Strategies Help

[← Edit Search](#) Save Search Search Summary ▾

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title Consensus dle F I R

RID 0K308KH7013 Search expires on 01-22 21:13 pm [Download All](#) ▾

Program BLASTN [?](#) [Citation](#) ▾

Database Genome (ROS_Cfam_1.0 reference, Annotation Release 106)
[See details](#) ▾

Query ID lcl|Query_27197

Description Consensus dle F I R

Molecule type dna

Query Length 570

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ [New](#) Select columns ▾ Show 100 ▾ [?](#)

select all 1 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Canis lupus familiaris isolate SID07034 breed Labrador retriever chromosome 31 ROS_Cfam_1.0	Canis lupus familiaris	1048	1048	100%	0.0	99.82%	39518933	NC_051835.1

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

25. Pomocí vlastní sekvenační analýzy i pomocí srovnání s referenčním genomem psa jsme potvrdili, že máme dostatek přesných sekvenčních dat v oblasti kauzální mutace *SOD1:c.52A>T*, která je u bernského salašnického psa zodpovědná za vznik onemocnění degenerativní myelopatie. Máme tudíž k dispozici spolehlivá vstupní data pro navržení diagnostické PCR-RFLP markeru. Rozdíl mezi mutovanou a nemutovanou alelou na úrovni námi získané konsensus sekvence je následující:

Nemutovaná (WILD) alela A

```
GTTTTAGAGCCGCTGGGCGGAGGGAGCCGGCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACGCCCC
CAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGCGATTGGCTGCGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGCGCTCCGGCCTATAAGAGCGCGCGGGCGCGCCCGCCTCGGTTTGCGTC
GGCGTCTGCTGCGGCGTCCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGTCGGAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGTGCGTGTTGA
AGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGCAACCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGGGCGGAGGCCGGCGGCCGGCGGGGCGGCGCCCGCGCACCTGTGCC
CCGGCGCGGCGTCCGGTCGGGCCTCGGGCGGTCCTCGTCACGCCCCGCGGCGCCGGGTTTGCGGGTTTCGCGCCGCCGAGGCCTGGACCCCGCGGGCGGGGCGGCGGCCGA
GTGCTGAGTCACCGCGC
```

Mutovaná (MUT) alela T

```
GTTTTAGAGCCGCTGGGCGGAGGGAGCCGGCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACGCCCC
CAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGCGATTGGCTGCGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGCGCTCCGGCCTATAAGAGCGCGCGGGCGCGCCCGCCTCGGTTTGCGTC
GGCGTCTGCTGCGGCGTCCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGTCGGAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGTGCGTGTTGA
AGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGCATCCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGGGCGGAGGCCGGCGGCCGGCGGGGCGGCGCCCGCGCACCTGTGCC
CCGGCGCGGCGTCCGGTCGGGCCTCGGGCGGTCCTCGTCACGCCCCGCGGCGCCGGGTTTGCGGGTTTCGCGCCGCCGAGGCCTGGACCCCGCGGGCGGGGCGGCGGCCGA
GTGCTGAGTCACCGCGC
```

26. Pro navržení PCR-RFLP markeru budeme vycházet z hypotézy, že bodová mutace *SOD1:c.52A>T* způsobí vznik nebo naopak ztrátu palindromu pro některou z komerčně dostupných restrikčních endonukleáz, Abychom minimalizovali riziko, že k restrikčnímu štěpení bude docházet i v jiném místě, než je *SOD1:c.52A>T*, je nezbytné navrhnout primerový pár, který bude nasedat blízko kauzálního SNP a bude poskytovat produkt o velikosti 170 – 200 bp. V získané konsensus sekvenci si žlutě vyznačíme oblast, která by připadala v úvahu jako potenciální PCR amplikon. Oblast je vhodné volit tak, aby se SNP nenacházelo přesně v polovině zamýšlené oblasti.

Mutovaná (MUT) alela T

```
GTTTTAGAGCCGCTGGGCGGAGGGAGCCGGCGCCGCGGGGCGCGAGGCTCCCCGCGCGGCCCCCGTGGTCCCGCCCCCGGCCCTCCTGGCCACTCACGTGCCGACGCCCC  
CAGGGGCGCGGGCCGGATGCGCGGGCGGGCGATTGGCTGCGGGCTGGGGTGGGCGGGGCGCGGCGCTCCGGCCTATAAGAGCGCGCGGC GCGCCCGCCTCGGTTTGCGTC  
GGCGTCTGCTGCGGCGTCCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGTGGAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGTGCGTGTGA  
AGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGC TCCATCCACTTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGGGCGGAG GCCGCGGCCGGCGGCCGGCGGCGGGGCGGCGCCCGCGCACCTGTGCC  
CCGGCGCGGCGTCCGGTCGGGCCTCGGGCGGTCCTCGTCACGCCCCGCGGCGCCGGGTTTGCGGGTTGCGGCCCGCCGAGGCCTGGACCCCGCGGCGGGGCGGCGGCCGA  
GTGCTGAGTACCGCGC
```

27. Pro navržení specifických primerů použijte program Primer3 (v. 0.4.0) (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Do vkládacího okna nakopírujte žlutě vyznačenou sekvenci z předchozího obrázku. Nastavte parametry, které jsou na nadcházejícím obrázku zvýrazněny červeně. U ostatních parametrů ponechejte implicitní nastavení.

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'>3', string of ACGTNaactn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINES, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#): NONE

```
CCGAGTCAATGAGATGAAAGCCGTGTGCTGTTGAAAGGCCAAGGCCCGGTGAAGGGCTCATCCACTTCTGTGAGAAAGCCAGGGCGGGGCGAG
```

Pick left primer, or use left primer below: Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below: Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Pick Primers Reset Form

Sequence Id: A string to identify your output.

Targets: E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

Excluded Regions: E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

Product Size Ranges: 179-190

Number To Return: 5 Max 3' Stability: 9.0

Max Repeat Mispriming: 12.00 Pair Max Repeat Mispriming: 24.00

Max Template Mispriming: 12.00 Pair Max Template Mispriming: 24.00

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: 18 Opt: 20 Max: 27

Primer Tm Min: 65 Opt: 69 Max: 70 Max Tm Difference: 100.0 [Table of thermodynamic parameters:](#) Breslauer et al. 1986

Product Tm Min: Opt: Max:

Primer GC% Min: 20.0 Opt: Max: 80.0

Max Self Complementarity: 8.00 Max 3' Self Complementarity: 3.00

Max #N's: 0 Max Poly-X: 5

Inside Target Penalty: Outside Target Penalty: 0 [Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.](#)

First Base Index: 1 CG Clamp: 0

Concentration of monovalent cations: 50.0 Salt correction formula: Schildkraut and Lifson 1965

Concentration of divalent cations: 0.0 Concentration of dNTPs: 0.0

Annealing Oligo Concentration: 50.0 (Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.)

Liberal Base Show Debugging Info Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus Lowercase masking

Pick Primers Reset Form

29. Vzhledem k tomu, že u psa domácího je dostupná referenční celogenomická sekvence, je možné provést bioinformatické vyhodnocení specifity navrženého primerového páru pomocí aplikace Web BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). V této aplikaci zvolte funkci Primer-BLAST.

The screenshot shows the NCBI BLAST website. At the top, there is a navigation bar with the BLAST logo and links for Home, Recent Results, Saved Strategies, and Help. Below this, the main content area is divided into several sections:

- Basic Local Alignment Search Tool:** A section describing the tool's function: "BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance." It includes a "Learn more" link.
- NEWS:** A box announcing a new version of IgBLAST (1.17) and a new field for "V frame shift" in the output.
- Web BLAST:** A section with three main options: "blastx" (translated nucleotide to protein), "tblastn" (protein to translated nucleotide), and "Protein BLAST" (protein to protein).
- BLAST Genomes:** A search box for selecting a genome, with options for Human, Mouse, Rat, and Microbes.
- Standalone and API BLAST:** Three options: "Download BLAST", "Use BLAST API", and "Use BLAST in the cloud".
- Specialized searches:** Four buttons for "SmartBLAST", "Primer-BLAST", "Global Align", and "CD-search", each with a brief description of its function.

30. Mezi nejaktuálnější celogenomické sekvence psa domácího patří ROS_Cfam_1.0 referenční sekvence. Sekvence jednotlivých chromozómů jsou v databázi NCBI uloženy pod následujícími čísly:

NC_051806.1
NC_051807.1
NC_051808.1
NC_051809.1
NC_051810.1
NC_051811.1
NC_051812.1
NC_051813.1
NC_051814.1
NC_051815.1
NC_051816.1
NC_051817.1
NC_051818.1
NC_051819.1
NC_051820.1
NC_051821.1
NC_051822.1
NC_051823.1
NC_051824.1
NC_051825.1
NC_051826.1
NC_051827.1
NC_051828.1
NC_051829.1
NC_051830.1
NC_051831.1
NC_051832.1
NC_051833.1
NC_051834.1
NC_051835.1
NC_051836.1
NC_051837.1
NC_051838.1
NC_051839.1
NC_051840.1
NC_051841.1
NC_051842.1
NC_051843.1
NC_051844.1

Čísla těchto sekvencí použijte při hodnocení specifity primerového páru v následující části úlohy.

31. Do vyhledávacího okna (Primer Parameters) vložte sekvence navrženého F a R primeru. Ostatní parametry na této části obrazovky ponechejte v původním nastavení.

The image shows the NCBI Primer-BLAST web interface. The browser address bar shows the URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome. The page title is "Primer-BLAST" and the subtitle is "A tool for finding specific primers". The main heading is "Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)".

The interface is divided into several sections:

- PCR Template:** Includes a text input field for "Enter accession, gi, or FASTA sequence" and a "Range" section with "From" and "To" fields for "Forward primer" and "Reverse primer".
- Primer Parameters:** This section is highlighted with a red box. It contains:
 - "Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)" with the input field containing "TCGGTTGCGTCGGCGTCT".
 - "Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)" with the input field containing "CCCGCCCTTGCCTTCTGC".
 - "PCR product size" with "Min" (70) and "Max" (1000) fields.
 - "# of primers to return" with a field containing "10".
 - "Primer melting temperatures (T_m)" with "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max T_m difference" (3) fields.
- Exon/intron selection:** Includes a dropdown for "Exon junction span" (set to "No preference") and "Exon junction match" with "Min 5' match" (7), "Min 3' match" (4), and "Max 3' match" (8) fields. There is also an "Intron inclusion" checkbox and an "Intron length range" section with "Min" (1000) and "Max" (1000000) fields.

32. Ve spodní části obrazovky zadejte referenční sekvence. Jedná se o parametry označené na následujícím obrázku červenými rámečky. Do okna Enter accession number vložte kopírováním všechna čísla sekvencí referenčních chromozómů uvedená na obrázku u kroku 30. Analýza bude testovat pozice primerů vůči celému genomu současně. Zbývající parametry ponechejte v implicitním nastavení.

The screenshot shows the NCBI Primer-BLAST web interface. The URL is https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome. The browser shows a OneDrive tab for 'Agrobiologie.cz - rozc...'. The interface includes several sections:

- Intron inclusion:** Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction (7, 4, 8).
 Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA.
- Intron length range:** Min: 1000, Max: 1000000.
- Note:** Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow.
- Primer Pair Specificity Checking Parameters:**
 - Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template.
 - Search mode:** Automatic (highlighted in yellow).
 - Database:** Custom (highlighted in yellow).
Enter accession number, gi, or FASTA sequence (Clear):
NC_051806.1
NC_051807.1
NC_051808.1
NC_051809.1
NC_051810.1
NC_051811.1 (highlighted in red boxes)
 - Or, upload file: Procházet... Soubor nevybrán.
- Exclusion:**
 - Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)
 - Exclude uncultured/environmental sample sequences
- Organism:** (highlighted in yellow)
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):** (highlighted in yellow)
- 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 amplicon size:** 1000 (highlighted in yellow)
- Allow splice variants:** Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

At the bottom, there are two checked checkboxes: Show results in a new window and Use new graphic view. A final note states: **Note:** Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow.

33. Po zadání vše parametrů vlastní analýzu spustíte funkcí Check, která je na následujícím obrázku zvýrazněna červeným rámečkem.

The screenshot shows the NCBI Primer-BLAST web interface. The browser address bar displays the URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi>. The page header includes the NIH logo and the text "U.S. National Library of Medicine" and "NCBI National Center for Biotechnology Information". The main heading is "Primer-BLAST" with the subtitle "A tool for finding specific primers". Below this, there is a sub-heading "Making primers specific to your PCR template. [more...](#)". A table shows the status of a submission:

Status	Submitted	Check
Current time	21 January 2021, 11:40:34	

At the bottom of the page, there is a footer with the text "BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine" and "NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA". There are also links for "Policies and Guidelines" and "Contact", and logos for "Support center", "Mailing list", "You Tube", "NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE", "NIH", and "USA.gov".

34. Funkce Primer-BLAST nyní vyhledá potenciální pozice dvojice primerů v genomu psa na základě parametrů, které byly zadány v předchozích krocích analýzy. Jedním z limitujících faktorů byla délka amplikonu 1000 bp. Výsledky hodnocení jsou seřazeny podle specifity nasedání primerového páru a podle jednotlivých chromozómů. Z následujícího obrázku je patrné, že dvojice primerů vykazovala 100% homologii pouze v jediném místě na 31. chromozómu. Jedná se oblast, kde předpokládáme výskyt kauzální mutace. Rovněž velikost amplikonu 179 bp se plně shoduje s výsledky navrhování primerů na základě našich sekvenčních dat.

Primer-BLAST » JOB ID:gYtexPcg-ojdsmq3Z9dOhR3MX7cw30SqMQ

Primer-BLAST Results

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Custom
 Other reports: Search Summary

Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCGGTTTGGCTCGGCGTCT	19	65.02	63.16	4.00	1.00
Reverse primer	CCCGCCCTTGCCTTCTGC	18	63.79	72.22	2.00	2.00

Products on target templates
 >NC_051835.1 Canis lupus familiaris isolate SID07034 breed Labrador retriever chromosome 31, ROS_Cfam_1.0, whole genome shotgun sequence

```

product length = 179
Forward primer 1   TCGGTTTGGCTCGGCGTCT 19
Template          26654832 ..... 26654850

Reverse primer 1   CCCGCCCTTGCCTTCTGC 18
Template          26655010 ..... 26654993

product length = 1026
Forward primer 1   TCGGTTTGGCTCGGCGTCT 19
Template          26654832 ..... 26654850

Reverse primer 1   CCCGCCCTTGCCTTCTGC 18
Template          26655857 ....T..C.....C. 26655840

product length = 1728
Reverse primer 1   CCCGCCCTTGCCTTCTGC 18
Template          30398746 A..T..A..T..... 30398729

Reverse primer 1   CCCGCCCTTGCCTTCTGC 18
Template          30397019 .T.T....CT..... 30397036
  
```

35. Předchozí analýzy potvrdily, že navržený pár primerů lze považovat za specifický. Nyní můžete přistoupit k potvrzení hypotézy, zde existují rozdíly v palindromech mezi ampliconem mutované a nemutované alely. V praxi se tato hypotéza testuje ještě dříve, než se provede finální navržení primerů. Z didaktického hlediska je tento krok analýzy zařazen až v této fázi, a to z důvodů názornosti a kontinuity procesu navrhování primerů. Pro identifikaci restričních míst (palindromů) použijte následující sekvence ampliconů nemutované a mutované alely:

PCR amplicon - nemutovaná (WILD) alela A

```
GCGCCCGCCTCGGTTTGCCTCGGCGTCTGCTGCGGCGTCCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGTCGGAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGA  
TGAAGGCCGTGTGCGTGTGAAGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGGCATCCATCCATTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGGGCGGAG
```

PCR amplicon - mutovaná (MUT) alela T

```
GCGCCCGCCTCGGTTTGCCTCGGCGTCTGCTGCGGCGTCCTCCGCTGCCCTCGGACTGCTGCAGCCGTCGGAGCCCGGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGCGAGTCATGGAGA  
TGAAGGCCGTGTGCGTGTGAAGGGCCAGGGCCCGGTGGAGGGGCATCCATCCATTCGTGCAGAAGGCAAGGGCGGGGCGGAG
```

Následující kroky analýzy provádějte nejprve pro alelu nemutovanou a stejný algoritmus použijte následně i pro alelu mutovanou.

36. Pro detekci restričních míst použijte aplikaci NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Zkopírujte sekvenci ampliconu nemutované alely z obrázku 35 a vložte ji do patřičného okna. Nastavte červeně označené parametry. Ostatní parametry ponechejte v implicitním nastavení.

Local sequence file: Procházet... Soubor nevybrán. Standard sequences: # Plasmid vectors # Viral + phage

GenBank number: [Browse GenBank]

or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)

```
GCGCCGCTCGGTTTCGGTCGGCTGTCTGCGGCTCCTCCGCTGCCCTCGGACTCTGCAGCCCTCGGA
GCGCGCCCGGAGCGCGCCCGCCCTCGGAGTCATGGAGATGAAGCCGTGTGGTGTGGAAGGGCCAGGGC
CCGGTGGAGGGCACCATCCACTTCGTGCAGAGGCAAGGGCGGGGCGGAG
```

Submit

The sequence is: Linear Circular

Enzymes to use: NEB enzymes All commercially available specificities All specificities All + defined oligonucleotide sequences Only defined oligonucleotide sequences [define oligos]

Minimum ORF length to display: 100 a.a.

Name of sequence: WILD (optional)

Earlier projects:

Note: Your earlier projects will be deleted 2 days after they were last accessed. You need to have cookies enabled in your browser for this feature to work. Delete projects

Disable NEBcutter cookies

37. Analýzu spustíte funkcí Submit, která je patrná na předchozím obrázku. První výstup u nemutované alely je uveden na následujícím obrázku. Jedná se o grafické znázornění restričních míst na hodnoceném amplikonu.

Linear Sequence: WILD

Display: - All commercial single cutter restriction enzymes
- Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs

GC=73%, AT=27%

Legend:

Cleavage code	Enzyme name code
✂ blunt end cut	Available from NEB
⏏ 5' extension	Has other supplier
⏏ 3' extension	Not commercially available
⏏ cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	#: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site

Control Panel:

- Main options:** New DNA, Custom digest, View sequence, ORF summary, Save project, Print
- Availability:** NEB, All
- Display:** 2 cutters, 3 cutters
- Zoom:** Zoom in, More...
- List:** 0 cutters, **1 cutters** (highlighted), All sites, Save all sites, Flanking enzymes

Minimum ORF length to display: 100 aa OK

38. Spuštěním funkce 1 cutters, která je na předchozím obrázku znázorněna červeným rámečkem se spustí podrobnější analýza, která vyhodnotí pouze ty restriční enzymy, která mají v rámci daného ampliconu pouze jedno štěpící místo. Tento typ enzymů je použitelný pro PCR-RFLP markery.

nc2.neb.com/NEBcutter2/listbycuts.php?name=0a69fde9-WILD&numcuts=1

Dokumenty – OneDrive Agrobiologie.cz – rozc...

Single cutters [Help](#) [Comments](#)

WILD

Number of cuts = OK Sort order: Alphabetical Save as text file

#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	AgsI	TT ₂ S [*] AA	list	132/131
2	Apal	G ₂ GGCC [*] C	list	*#145/141
3	BanI	G [*] GYRC ₂ C	list	154/158
4	BclI	CCATC [*] NNN [*] N ₂	list	166/167
5	BsgI	GTGCAG (N) ₁₄ NN [*]	list	190/188
6	BssHIII	G [*] CGCC ₂ C	list	*85/89
7	BstNI	CC [*] W ₂ GG	list	139/140
8	BtsCI	GGATG ₂ NN [*]	list	158/156
9	CviAII	C [*] AT ₂ G	list	105/107
10	DraIII	CAC ₂ NNN [*] GIG	list	*168/165
11	EcoO109I	RG [*] GNC ₂ CY	list	#141/144
12	EcoP15I	CAGCAG (N) ₂₅ NN ₂	list	28/30
13	FaiI	YA [*] TR	list	106
14	FatI	[*] CATG ₂	list	104/108
15	FokI	GGATG (N) ₉ NNNN ₂	list	145/149
16	Hinfi	G [*] ANT ₂ C	list	*101/104
17	Hpy188III	TC [*] NN ₂ GA	list	*98/100
18	MlyI	GAGTC (N) ₅ [*]	list	110
19	MmeI	TCCRAC (N) ₁₅ NN [*]	list	*48/46
20	MslI	CAYNN [*] NNRTG	list	109
21	MspAII	CMG [*] CKG	list	*44
22	NlaIII	₂ CATG [*]	list	108/104
23	NruI	TCG [*] CGA	list	*99
24	PleI	GAGTC [*] NNNN [*] N ₂	list	109/110
25	PspGI	[*] CCWGG ₂	list	#137/142
26	PspOMI	G [*] GGCC ₂ C	list	*#141/145
27	PstI	C ₂ TGCA [*] G	list	63/59
28	SfiI	C [*] TRYA ₂ G	list	59/63
29	TauI	G ₂ CSG [*] C	list	*35/32
30	TspDTI	ATGAA (N) ₉ NN [*]	list	127/125

40. Detailní výsledek restriční analýzy mutované alely je znázorněn na tomto obrázku.

nc2.neb.com/NEBcutter2/listbycuts.php?name=0a69fde9-MUT&numcuts=1

Dokumenty - OneDrive Agrobiologie.cz - rozc...

Single cutters

MUT

Number of cuts = 1 OK Sort order: Alphabetical Save as text file

#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	AgsI	TT_S^AA	list	132/131
2	Apal	G_GGCC^C	list	*#145/141
3	BaeGI	G^GCM^C	list	145/141
4	BccI	CCATCNNNN^N	list	166/167
5	BsgI	GTGCG(N)_14^NN^	list	190/188
6	BssHII	G^CGCG_C	list	*85/89
7	BstNI	CC^W^GG	list	139/140
8	BtsCI	GGATG_NN^	list	158/156
9	CviAII	C^AI_G	list	105/107
10	DraIII	CAC_NNN^GTG	list	*168/165
11	EcoO109I	RG^GNC_CY	list	#141/144
12	EcoP15I	CAGCAG(N)_25^NN^	list	28/30
13	FaiI	YA^TR	list	106
14	FatI	^CATG^	list	104/108
15	FokI	GGATG(N)_9^NNNN^	list	145/149
16	HinfI	G^ANT_C	list	*101/104
17	Hpy188III	TC^NN_GA	list	*98/100
18	MlyI	GAGTC(N)_5^	list	110
19	MmeI	TCCRAC(N)_18^NN^	list	*48/46
20	MslI	CAYNN^NNRTG	list	109
21	MspAII	CMG^CRG	list	*44
22	NlaIII	^CATG^	list	108/104
23	NruI	TCG^CGA	list	*99
24	PleI	GAGTCNNNN^N	list	109/110
25	PspGI	^CCWGG^	list	#137/142
26	PspOMI	G^GGCC_C	list	*#141/145
27	PstI	C^TGCA^G	list	63/59
28	SfiI	C^TRYA_G	list	59/63
29	TauI	G_CSG^C	list	*35/32
30	TspDTI	ATGAA(N)_9^NN^	list	127/125

[Back to main display](#)

[Help](#) [Comments](#)

41. Dalším krokem restrikční analýzy je porovnání nalezených restrikčních míst u nemutované a mutované alely. Porovnání výše prezentovaných výsledků znázorňuje následující obrázek. Enzym, který umožní odlišit obě alely, je zvýrazněn červeným rámečkem.

Single cutters					Single cutters				
WILD					MUT				
Number of cuts = <input type="text" value="1"/> <input type="button" value="OK"/> Sort order: <input type="text" value="Alphabetical"/> <input type="button" value="Save as text file"/>					Number of cuts = <input type="text" value="1"/> <input type="button" value="OK"/> Sort order: <input type="text" value="Alphabetical"/> <input type="button" value="Save as text file"/>				
#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)	#	Enzyme	Specificity	Sites & flanks	Cut positions (blunt - 5' ext. - 3' ext.)
1	AgsI	TT ₁ S ₁ AA	list	132/131	1	AgsI	TT ₁ S ₁ AA	list	132/131
2	ApaI	G ₁ GGCC ₁ C	list	*#145/141	2	ApaI	G ₁ GGCC ₁ C	list	*#145/141
3	BanI	G ⁺ GYRC ₁ C	list	154/158	3	BaeGI	G ₁ RGCM ₁ C	list	145/141
4	BccI	CCATCNNNN ₁ N ₁	list	166/167	4	BccI	CCATCNNNN ₁ N ₁	list	166/167
5	BsgI	GTGCAG (N) ₁₄ NN ⁺	list	190/188	5	BsgI	GTGCAG (N) ₁₄ NN ⁺	list	190/188
6	BssHII	G ⁺ CGCG ₁ C	list	*85/89	6	BssHII	G ⁺ CGCG ₁ C	list	*85/89
7	BstNI	CC ⁺ W ₁ GG	list	139/140	7	BstNI	CC ⁺ W ₁ GG	list	139/140
8	BtsCI	GGATG ₁ NN ⁺	list	158/156	8	BtsCI	GGATG ₁ NN ⁺	list	158/156
9	CviAII	C ⁺ AT ₁ G	list	105/107	9	CviAII	C ⁺ AT ₁ G	list	105/107
10	DraIII	CAC ₁ NNN ⁺ GTG	list	*168/165	10	DraIII	CAC ₁ NNN ⁺ GTG	list	*168/165
11	EcoO109I	RG ⁺ GNC ₁ CY	list	#141/144	11	EcoO109I	RG ⁺ GNC ₁ CY	list	#141/144
12	EcoP15I	CAGCAG (N) ₂₅ NN ₁	list	28/30	12	EcoP15I	CAGCAG (N) ₂₅ NN ₁	list	28/30
13	FaiI	YA ₁ TR	list	106	13	FaiI	YA ₁ TR	list	106
14	FatI	⁺ CATG ₁	list	104/108	14	FatI	⁺ CATG ₁	list	104/108
15	FokI	GGATG (N) ₉ NNNN ₁	list	145/149	15	FokI	GGATG (N) ₉ NNNN ₁	list	145/149
16	Hinfl	G ⁺ ANT ₁ C	list	*101/104	16	Hinfl	G ⁺ ANT ₁ C	list	*101/104
17	Hpy188III	TC ⁺ NN ₁ GA	list	*98/100	17	Hpy188III	TC ⁺ NN ₁ GA	list	*98/100
18	MlyI	GAGTC (N) ₅ ₁	list	110	18	MlyI	GAGTC (N) ₅ ₁	list	110
19	MmeI	TCCRAC (N) ₁₈ NN ⁺	list	*48/46	19	MmeI	TCCRAC (N) ₁₈ NN ⁺	list	*48/46
20	MslI	CAYNN ⁺ NNRTG	list	109	20	MslI	CAYNN ⁺ NNRTG	list	109
21	MspAII	CMG ⁺ CKG	list	*44	21	MspAII	CMG ⁺ CKG	list	*44
22	NlaIII	₁ CATG ⁺	list	108/104	22	NlaIII	₁ CATG ⁺	list	108/104
23	NruI	TCG ⁺ CGA	list	*99	23	NruI	TCG ⁺ CGA	list	*99
24	PleI	GAGTCNNNN ₁ N ₁	list	109/110	24	PleI	GAGTCNNNN ₁ N ₁	list	109/110
25	PspGI	⁺ CCWGG ₁	list	#137/142	25	PspGI	⁺ CCWGG ₁	list	#137/142
26	PspOMI	G ⁺ GGCC ₁ C	list	*#141/145	26	PspOMI	G ⁺ GGCC ₁ C	list	*#141/145
27	PstI	C ₁ TGCA ⁺ G	list	63/59	27	PstI	C ₁ TGCA ⁺ G	list	63/59
28	SfcI	C ⁺ TRYA ₁ G	list	59/63	28	SfcI	C ⁺ TRYA ₁ G	list	59/63
29	TauI	G ₁ CSG ⁺ C	list	*35/32	29	TauI	G ₁ CSG ⁺ C	list	*35/32
30	TspDII	ATGAA (N) ₉ NN ⁺	list	127/125	30	TspDII	ATGAA (N) ₉ NN ⁺	list	127/125

42. Z předchozího obrázku vyplývá, že enzym *BanI* štěpí pouze nemutovanou alelu (WILD, A) a naopak enzym *BaeGI* štěpí pouze mutovanou (MUT, T) alelu. Byly tak nalezeny dva nezávislé PCR-RFLP markery. Vzhledem k tomu, že enzym *BanI* je komerčně dostupnější, zaměřte se v následující části úlohy na interpretaci výsledků při použití tohoto enzymu. Z předchozího obrázku je patrné, že enzym *BanI* vytváří lepivé neboli kohezivní konce. U následujících genotypů budou vznikat výše uvedené fragmenty:

Homozygot nesoucí obě nemutované alely (A/A):	158 bp a 21 bp (amplikon je štěpen)
Homozygot nesoucí obě mutované alely (T/T):	179 bp (amplikon není štěpen)
Heterozygot nesoucí oba typy alel (A/T):	179 bp a 158bp a 21bp (štěpen je pouze jeden z aplikonů)

Praktická aplikace navrženého kodominantního PCR-RFLP markeru s cílem detekovat alelické kombinace genu *SOD1* je znázorněna na následujícím obrázku.

