

# Palindromy, restriční enzymy, primery

**C2131 Úvod do bioinformatiky**

**Jaro 2024**

Mgr. Josef Houser, Ph.D.

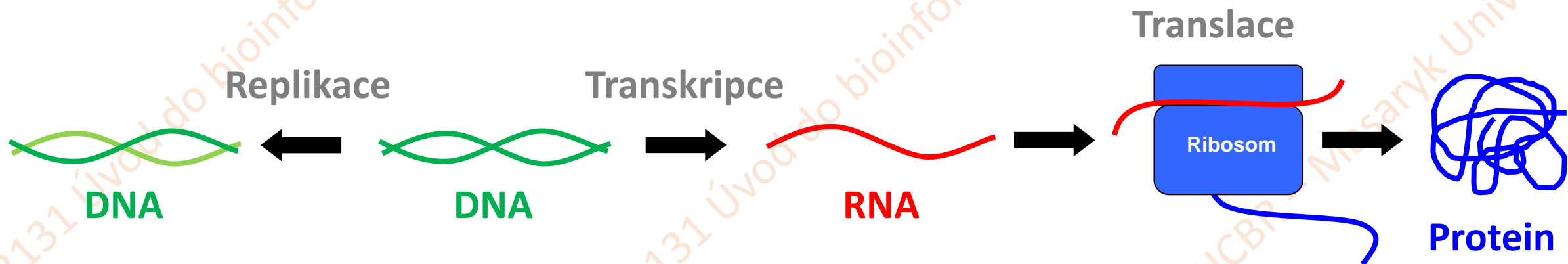
# Nukleové kyseliny

- Dlouhý, nerozvětvený polymer tvořený čtyřmi typy monomerů. Informace je uložena v **pořadí (sekvenci)** monomerů.
- **DNA** – deoxyribonukleová kyselina – vlastní nosič genetické informace (skoro vždy)
- **RNA** – ribonukleová kyselina
- **Sekvence** je vždy zapisována od 5' ke 3' konci

# Interakce nukleová kyselina – protein

Přenos genetické informace je vícekrokový proces

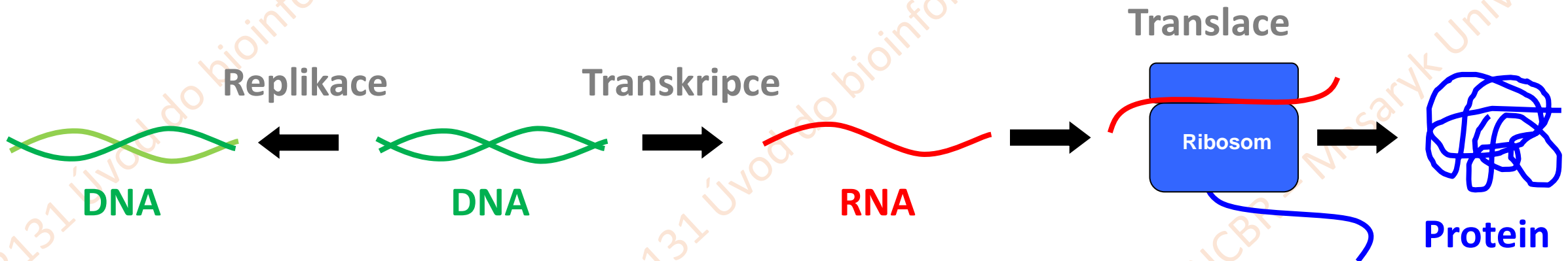
Všechny kroky probíhají za účasti proteinů



# Interakce nukleová kyselina – protein

Proteiny se podílí i na dalších interakcích s nukleovými kyselinami

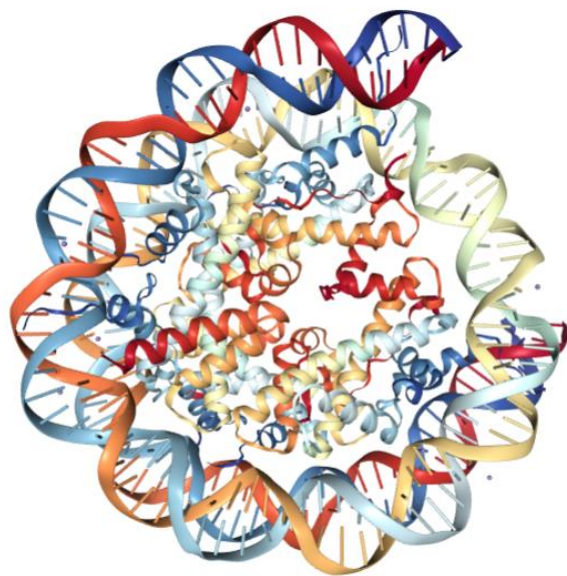
- Modifikace NK
- Regulace exprese
- Transport
- Degradace



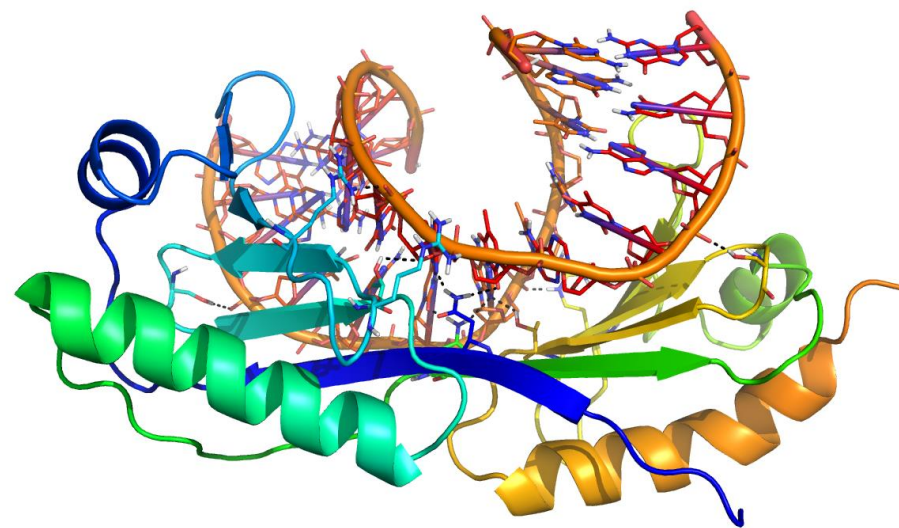
# Interakce nukleová kyselina – protein

Interakce protein – nukleová kyselina může být:

- **Nespecifická** – vazba na cukr-fosfátovou kostru
- **Specifická** – zahrnující rozpoznávání bází = sekvence



Nukleosom – nespecifická interakce histonu s DNA



TATA-vázající protein – specifická interakce s DNA

NCBR – Masaryk University

C2131 Úvod do bioinformatiky

C2131 Úvod do bioinformatiky

# Palindromy

C2131 Úvod do bioinformatiky

C2131 Úvod do bioinformatiky

NCBR – Masaryk University

# Palindrom

- Specifický případ sekvence, která je z obou stran stejná

## Matematika

0  
11  
121  
12321  
123321  
95135753159

## Jazyk

OKO  
KAJAK  
RADAR  
Kobyla má malý bok.  
Jelenovi pivo nelej.

## Hudba



Joseph Haydn  
Symfonie 47 v G dur



# Palindrom


- V biologii (biochemii) se palindromy vyskytují v **sekvencích DNA**
- Aby mohla být sekvence palindrom, **MUSÍ** se číst zepředu a zezadu stejně – **POZOR**, sekvence biopolymerů (proteiny, DNA, RNA) jsou orientované!!! A proto:

Protein: MELEM 

N-Met-Glu-Leu-Glu-Met-C

≠

C-Met-Glu-Leu-Glu-Met-N

RNA/ssDNA: AGCCGA 

5'-A-G-C-C-G-A-3'

≠

3'-A-G-C-C-G-A-5'

DNA: TCATGA 

5'-T-C-A-T-G-A-3'  
3'-A-G-T-A-C-T-5'

=

3'-A-G-T-A-C-T-5'

5'-T-C-A-T-G-A-3'

=

5'-T-C-A-T-G-A-3'

3'-A-G-T-A-C-T-5'



# Palindromatické sekvence v DNA

- Sekvence, která je totožná s KOMPLEMENTÁRNÍ sekvencí (vždy sudý počet nukleotidů)

- Dvoupísmenné (celkem 4, bez zvláštního významu)                      AT              TA              CG              GC

- **Čtyřpísmenné** (celkem 16)

AATT	ATAT	AGCT	ACGT
TATA	TTAA	TGCA	TCGA
GATC	GTAC	GGCC	GCGC
CATG	CTAG	CGCG	CCGG

- **Šestipísmenné** (celkem 64)

AAATTT	AATATT	ATATAT	ATTAAT	TAATTA	TATATA	TTATAA	TTTAAA
AAGCTT	...						
...							

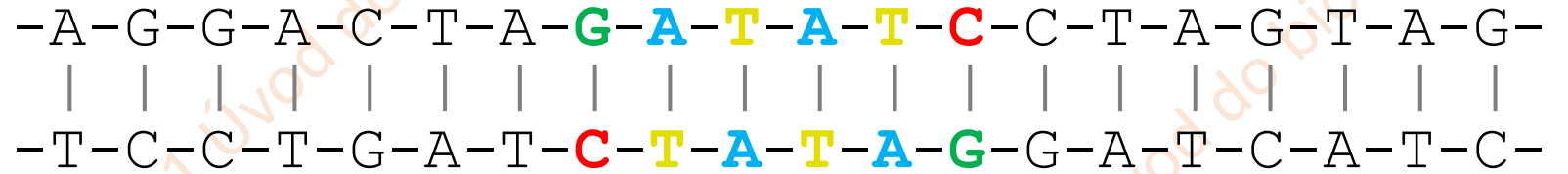
- Delší

# Výskyt palindromů v DNA

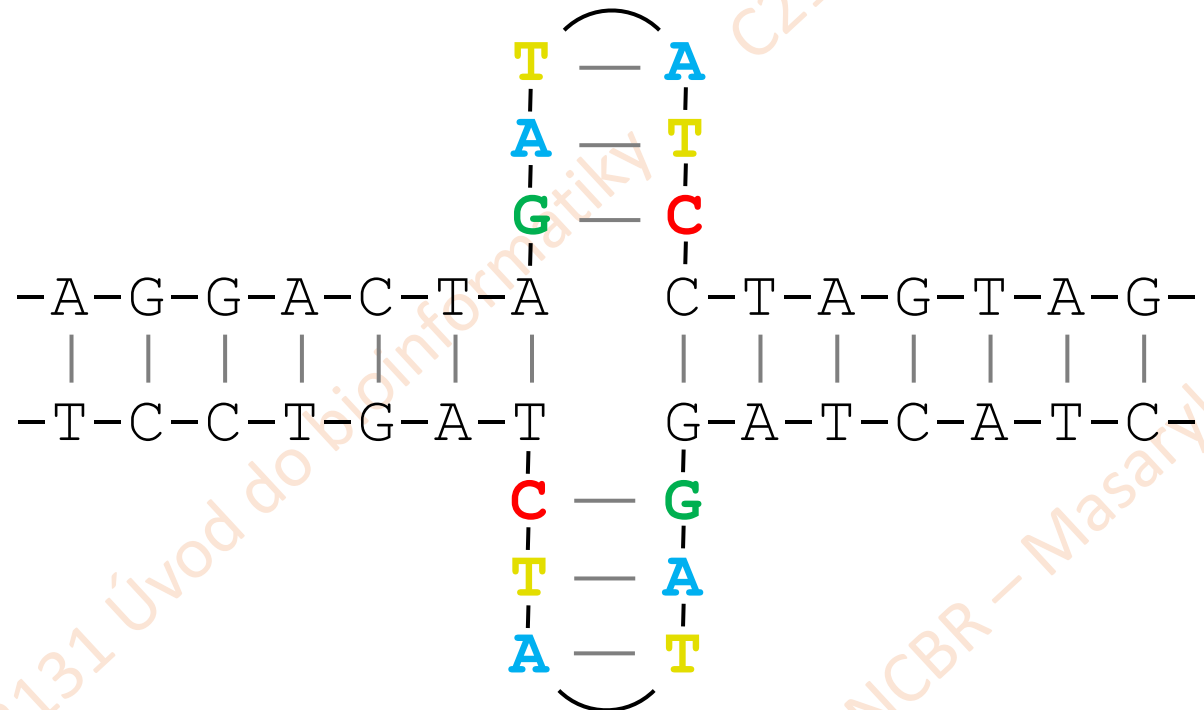
- Náhodný – čistě statisticky se mohou palindromy vyskytovat často:
  - Dvoupísmenný – průměrně každá 4. dvojice
  - Čtyřpísmenný – průměrně každá 16. čtveřice
  - Šestipísmenný – průměrně každá 64. šestice
- **Cílený** – využívaný buňkou pro rozpoznávání/manipulaci DNA
- V reálné DNA je **náhodný výskyt palindromů potlačen**  
(je jich méně, než by se dalo čekat na základě náhodného výskytu)

# Struktura DNA palindromů

- **Standardní párování**

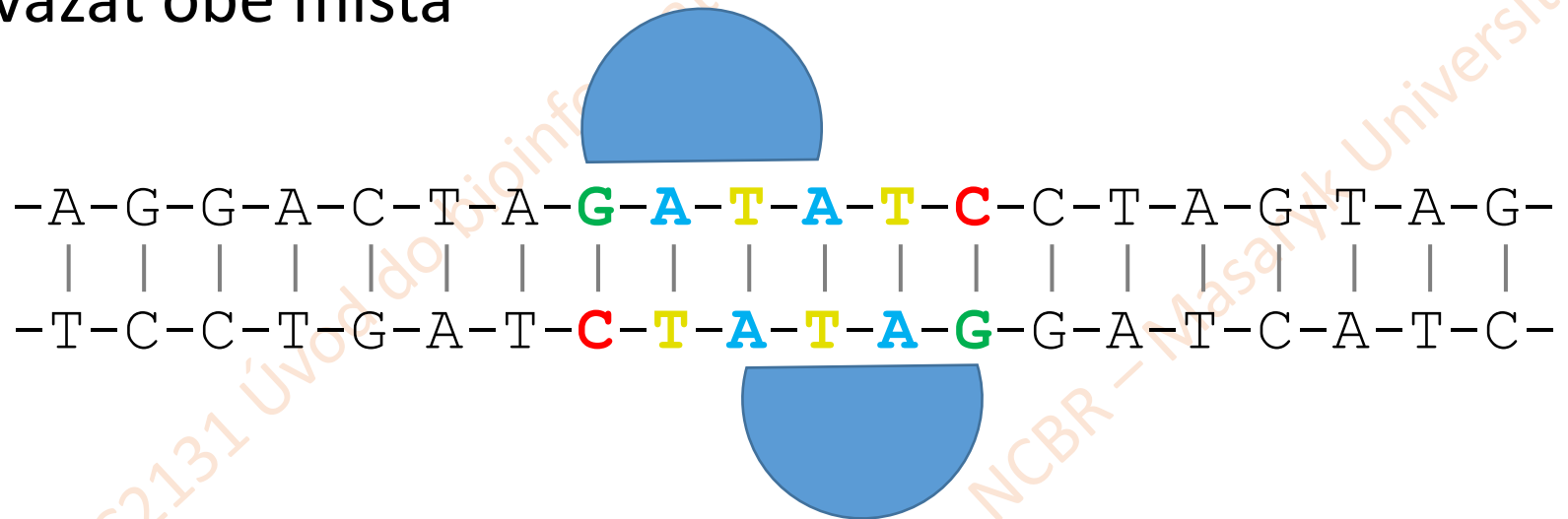


- **Tvorba vlásenek**

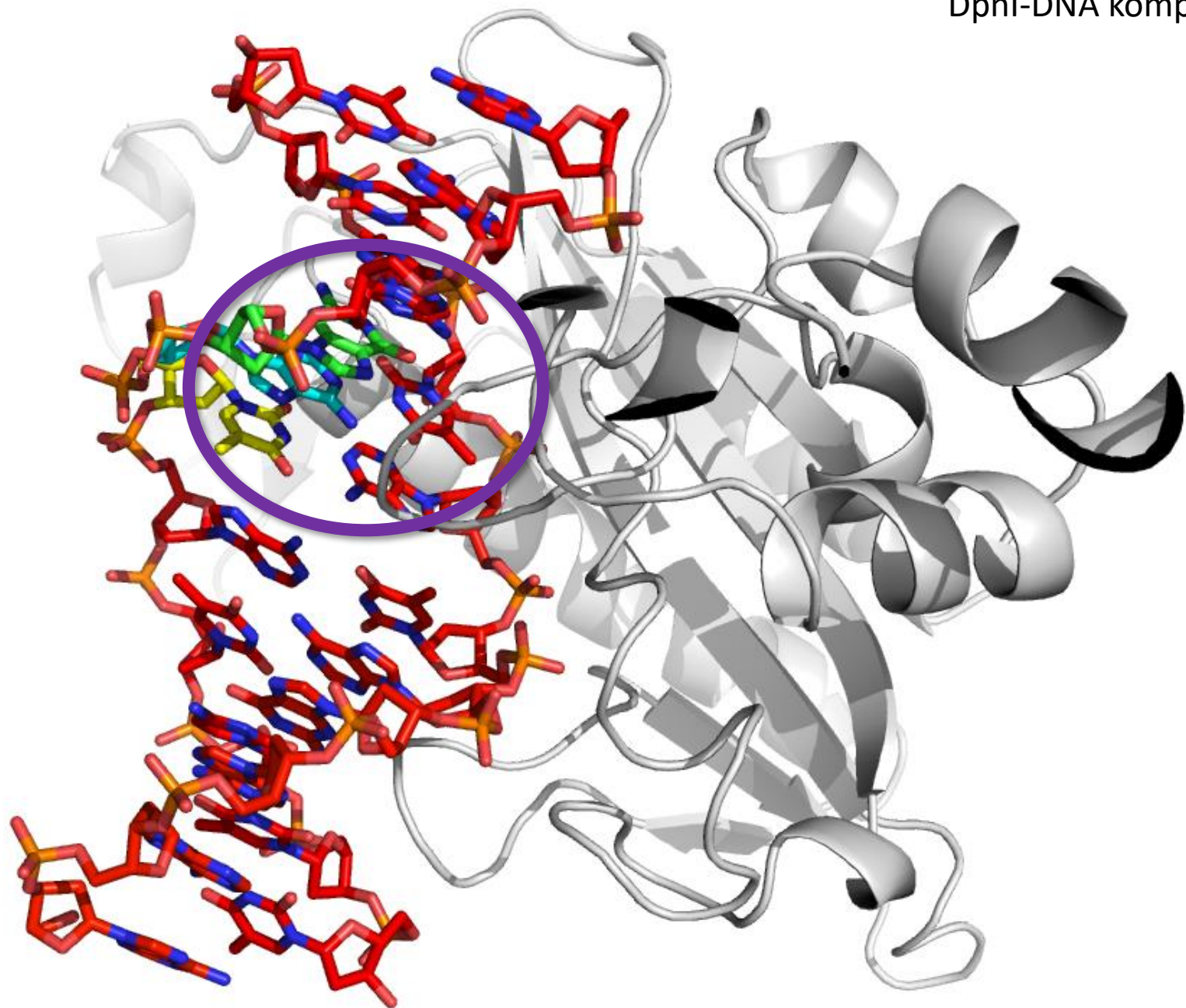


# Palindromy a interakce s proteiny

- Díky palindromu se opakovaná sekvence vyskytuje dvakrát naproti sobě
- Protein může rozpoznat DNA na dvou blízkých místech
- **Dimer** proteinu může vázat obě místa
  - Výrazně silnější vazba
  - Vyšší specifita



DpnI-DNA komplex

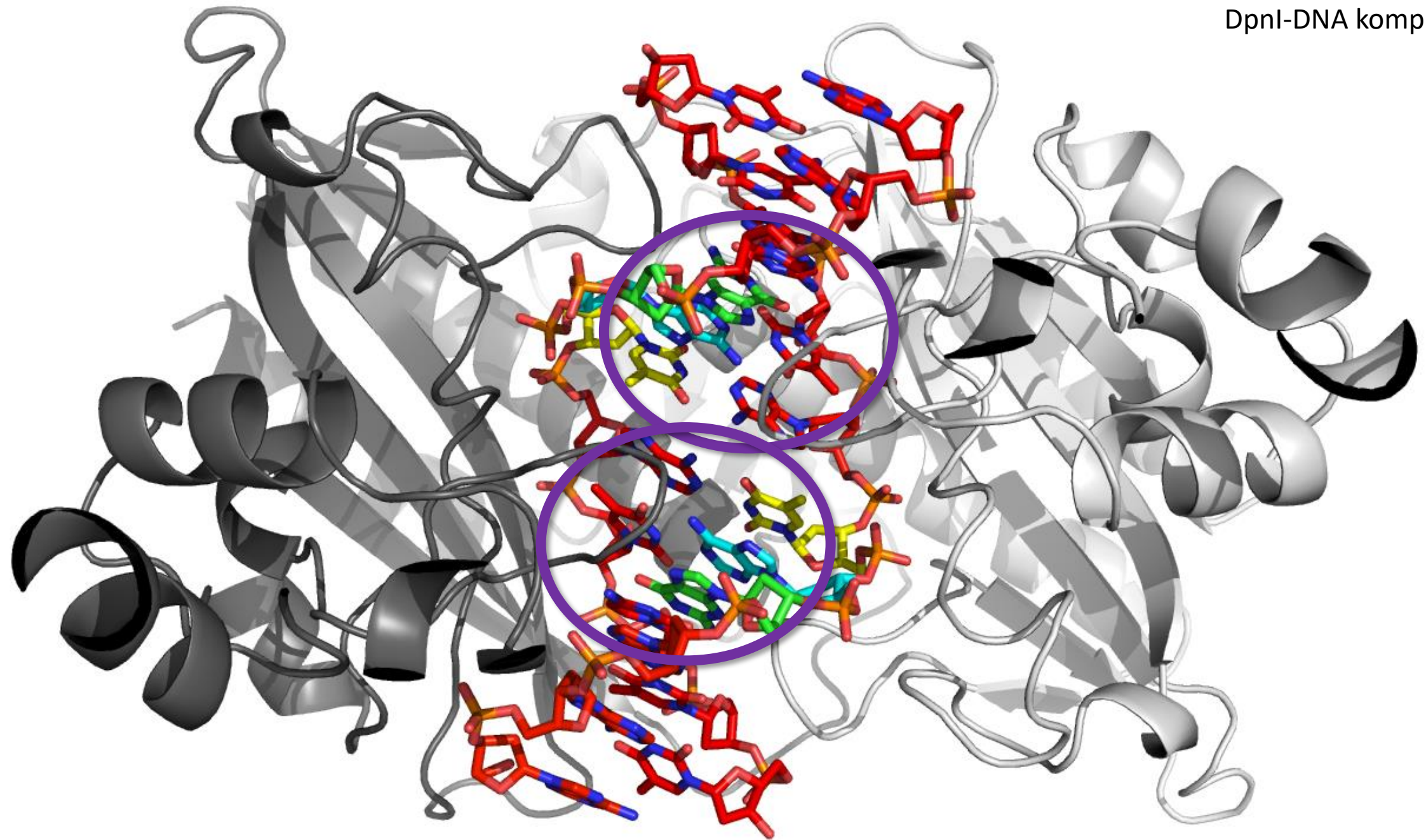


NCr

'sity

C27

DpnI-DNA komplex



NCr

'sity

C27

NCBR – Masaryk University

C2131 Úvod do bioinformatiky

# Restrikční endonukleasy

C2131 Úvod do bioinformatiky

C2131 Úvod do bioinformatiky

NCBR – Masaryk University

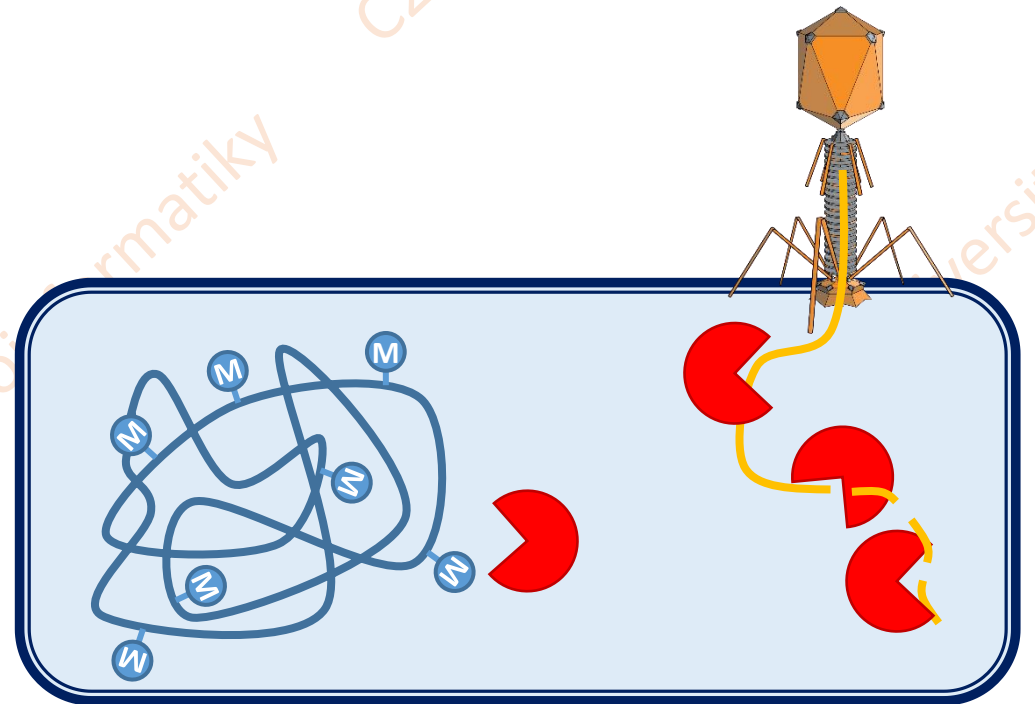
# Restrikční endonukleasy

- **Nukleasy** – proteiny štěpící DNA
- **Exonukleasy** – štěpí DNA od konce
- **Endonukleasy** – štěpí DNA uvnitř řetězce
- **Restrikční endonukleasy** – štěpí DNA po vazbě na určité místo sekvence (často jde právě o palindrom)



# Restrikční endonukleasy (RE)

- RE jsou enzymy **bakteriálního původu**
- Typicky existují v komplexu s methylasou, která methyluje vlastní DNA
- Slouží pro **ochranu** před bakteriofágy – štěpí fágovou DNA (nemethylovanou)



# Název restričních endonukleas

- První písmeno rodového jména
- První dvě písmena druhového jména
- Další rozlišení (kmen, typ...)
- Pořadové číslo v daném organismu

Např.: EcoRI – *Escherichia coli* RY13  
BamHI – *Bacillus amyloliquefaciens* H  
Sacl – *Streptomyces achromogenes*  
HindIII – *Haemophilus influenzae* Rd  
Sall – *Streptomyces albus* G

EcoRI

*Escherichia coli* kmen RY13

První popsaná restriktasa z této *E. coli*

# Klasifikace RE

- **Klasifikace** podle místa štěpení a kofaktorů
  - Typ I – proteinový komplex, náhodné místo štěpení
  - **Typ II** – štěpí v definovaném místě v blízkosti rozpoznávané sekvence, Mg<sup>2+</sup> ionty jako kofaktor
  - Typ III – hydrolyzují ATP, specifické místo štěpení
  - Typ IV – štěpí modifikovanou DNA (např. methylovanou)

- Existuje větší množství **podtypů**

Table 1. Subtypes of Type II REases

Subtype <sup>a</sup>	Defining feature	Examples	Recognition sequence
A	Asymmetric recognition sequence	FokI AclI	GGATG (9/13) CCGC (-3/-1)
B	Cleaves both sides of target on both strands	BglI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)
C	Symmetric or asymmetric target. R and M functions in one polypeptide	GsuI HaeIV BclI	CTGGAG (16/14) (7/13) GAYNNNNNRTC (14/9) (10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)
E	Two targets; one cleaved, one an effector	EcoRII NaeI	↓CCWGG GCC↓GGC
F	Two targets, both cleaved coordinately	SfiI SgrAI	GGCCNNNN↓NGGCC CR↓CCGGYG
G	Symmetric or asymmetric target. Affected by AdoMet	BsgI Eco57I	GTGCAG (16/14) CTGAAG (16/14)
H	Symmetric or asymmetric target. Similar to Type I gene structure	BclI AhdI	(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10) GACNNN↓NNGTC
M	Subtype IIP or IIA. Require methylated target	DpnI	Gm6 A↓TC
P	Symmetric target and cleavage sites	EcoRI PpuMI BslI	G↓AATTC RG↓GWCCY CCNNNNN↓NNGG
S	Asymmetric target and cleavage sites	FokI MmeI	GGATG (9/13) TCCRAC (20/18)
T	Symmetric or asymmetric target. R genes are heterodimers	Bpu10I BslI	CCTNAGC (-5/-2) <sup>b</sup> CCNNNNN↓NNGG

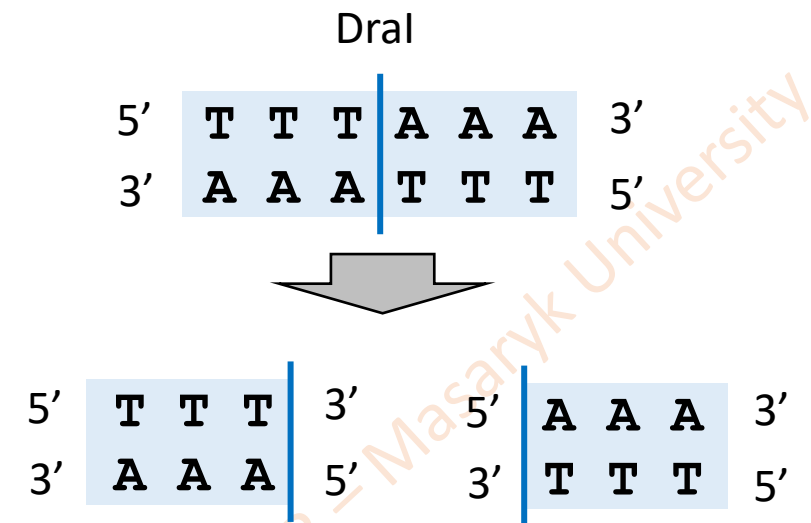
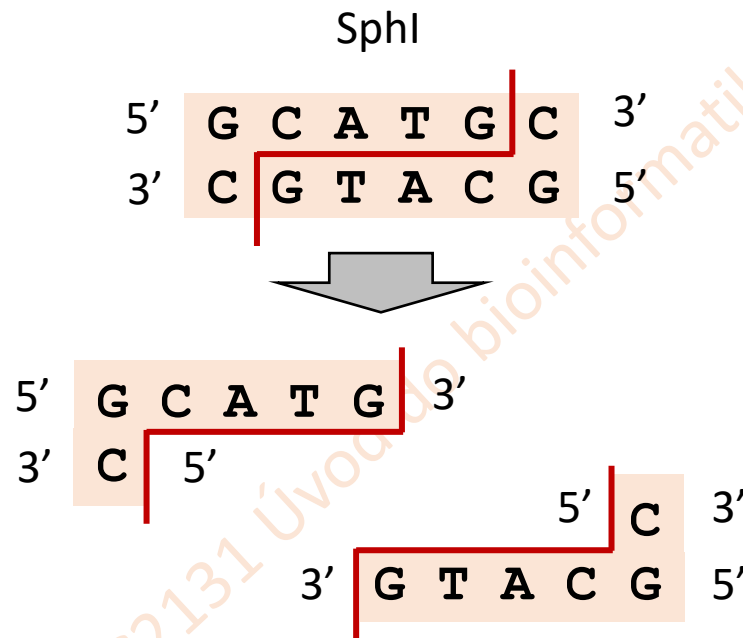
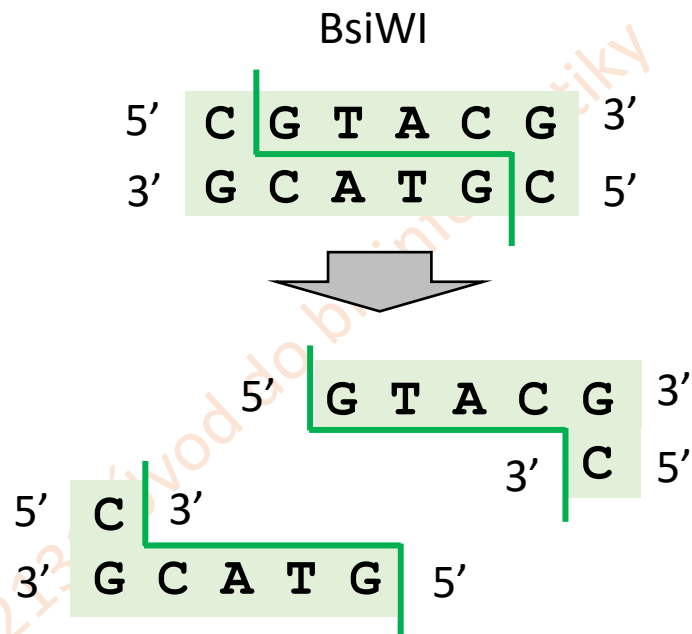
<sup>a</sup>Note that not all subtypes are mutually exclusive. E.g. BslI is of subtype P and T.

<sup>b</sup>The abbreviation indicates double strand cleavage as shown below:

5' C C ↓ T N A G C  
3' G G A N T ↑ C G

# Štěpení – tvorba konců na DNA

- RE typicky štěpí obě vlákna DNA ve stejném místě sekvence
- V závislosti na pozici štěpení mohou vznikat:
  - 5' převislé konce (5' overhangs)
  - 3' převislé konce (3' overhangs)
  - Tupé konce (blunt ends)



# Schizomery

- **Isoschizomery** – dvě RE, které mají stejnou specifitu (rozpoznávají stejnou sekvenci a štěpí ji stejně)

HpaII: C↓CGG

MspI: C↓CGG

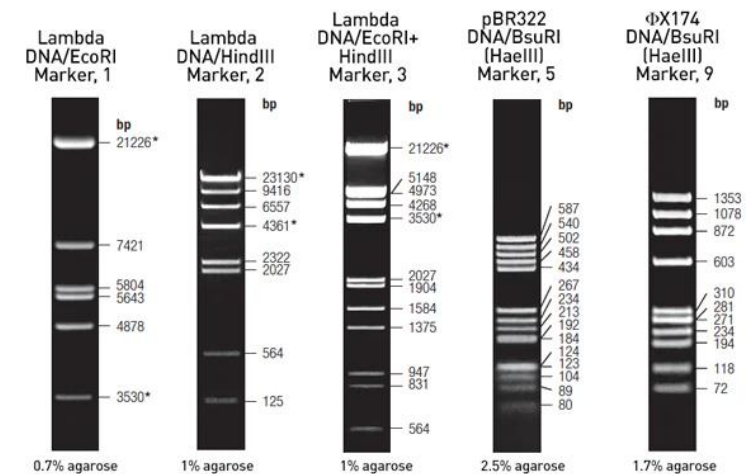
- **Neoschizomery** – rozpoznávají stejnou sekvenci, avšak štěpí ji různě

AatII: GACGT↓C

ZraI: GAC↓GTC

# Využití restričních endonukleas

- Charakterizace **fágové DNA**
- Tvorba **velikostních standardů DNA**
- **Analýza DNA** – mutace, množství kopií genů
- Příprava DNA **pro sekvenaci** a další analýzy
- Modifikace DNA (**klonování**) – tvorba GMO



\*Cohesive ends (the 12 nt cos site of lambda DNA) may anneal and form additional bands.

ThermoFisher Scientific

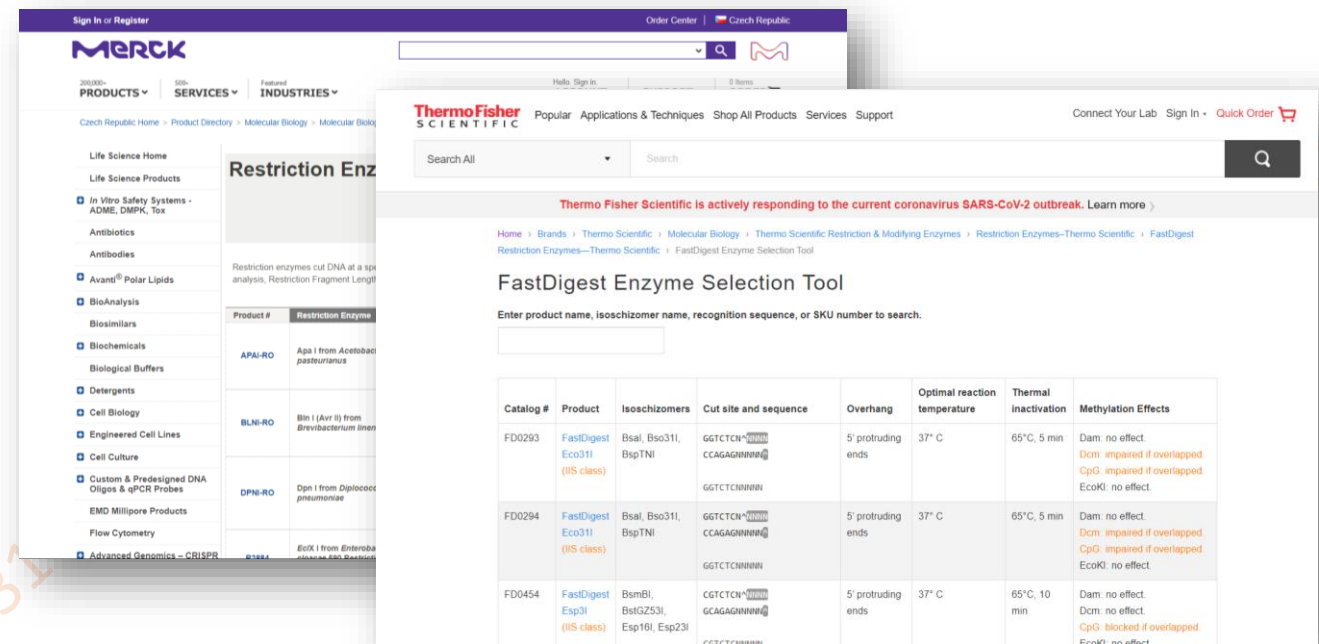
Naštěpená fágová DNA sloužící jako velikostní standardy pro DNA elektroforézu

# Databáze restrikčních endonukleas

- Typicky spravované výrobci restrikčních endonukleas
  - Pozor: Mohou obsahovat jen enzymy daného výrobce !
- Obsahují název, rozpoznávané místo, způsob štěpení a další informace
- Často včetně **nástrojů** pro analýzu a vyhledávání

Příklady:

- New England Biolabs (NEB)
- **REBASE** (spravováno NEB)
- ThermoFisher Scientific
- a další






ThermoFisher Scientific is actively responding to the current coronavirus SARS-CoV-2 outbreak. Learn more

Home » Brands » Thermo Scientific » Molecular Biology » Thermo Scientific Restriction & Modifying Enzymes » Restriction Enzymes—Thermo Scientific » FastDigest Restriction Enzymes—Thermo Scientific » FastDigest Enzyme Selection Tool

### FastDigest Enzyme Selection Tool

Enter product name, isoschizomer name, recognition sequence, or SKU number to search.

Catalog #	Product	Isoschizomers	Cut site and sequence	Overhang	Optimal reaction temperature	Thermal inactivation	Methylation Effects
FD0293	FastDigest Eco311 (HS class)	Bsal, Bso311, BspTNI	GGTCTCH-  CCAGAGNNNN	5' protruding ends	37° C	65°C, 5 min	Dam: no effect. Dcm: impaired if overlapped CpG: impaired if overlapped EcoKI: no effect.
FD0294	FastDigest Eco311 (HS class)	Bsal, Bso311, BspTNI	GGTCTCH-  CCAGAGNNNN	5' protruding ends	37° C	65°C, 5 min	Dam: no effect. Dcm: impaired if overlapped CpG: impaired if overlapped EcoKI: no effect.
FD0454	FastDigest Esp31 (HS class)	BsmBI, BstGZ531, Esp161, Esp231	CGTCTCH-  GCAGAGNNNN	5' protruding ends	37° C	65°C, 10 min	Dam: no effect. Dcm: no effect. CpG: blocked if overlapped EcoKI: no effect.

# REBASE

- Nejobsáhlejší („kompletní“) databáze restrikčních enzymů

<http://rebase.neb.com/>







Use this tool as a guide to the ever-changing landscape of restriction enzymes.  
REBASE is a dynamic, curated database of restriction enzymes and related proteins.

## RESOURCES ?

Data files  
Sequence data  
PacBio data  
Crystal Data  
Methylation Sensitivity

Lists and compilations  
Tools  
Enzymes  
Genomes  
Suppliers

Publications  
Related websites  
FTP

-  WHAT'S NEW?
-  SUBMIT DATA
-  SUBSCRIBE
-  CONTACT US

## SEARCH ?

use quotes around phrases

by

Search

Clear

[Advanced Search](#)



ABOUT REBASE



CITING REBASE



HELP



Classic



# REBASE

- Enzymy podle typů, podle rozpoznávaných sekvencí, ...

## REBASE Lists

Citing REBASE...

### Enzyme Navigation Tables:

- All Acronyms...
- Enzymes Grouped by Type
- Prototypes/neoschizomers...
- Newest Enzymes

### REBASE Genomes:

- Genome List...
- Genomes with shotgun...
- Archaea summary
- Bacteria summary

### Sequence Collections:

- Download DNA/Protein sequences...
- Collect customized FastA files...
- Type II specificities...
- Sequenced Type II R genes...
- Methyltransferases...
- Methyltransferases with protein seqs...
- Methyltransferases with refs...
- Cloned/Sequenced enzymes...
- COG table...
- PID table...
- RM gene coordinates in sequenced genomes...
- Genbank Cross Reference...
- Protein Id Cross Reference...
- UniProtKB Cross Reference...
- GI Cross Reference...
- Jumbo Cross Reference...

### Specialized Information:

- PacBio...
- Restriction enzyme properties...
- Split Type II rec seqs...
- Methylase recognition sequences...
- Methylase recognition sequences (plain text)...
- Type II m4C methylases (plain text)
- Type II m5C methylases (plain text)
- Type II 6mA methylases (plain text)
- Type II m4C, m5C, and 6mA methylases (plain text)
- FDA Salmonella strain summary...
- Gold Standard...
- Prophages...
- Pt components...
- Type I recognition sequences...
- Type I S subunit TRD sequences...
- Gold Standards Type I S subunit TRD sequences...
- Fused enzymes...
- Crystal data...
- N-term data...
- Star Activity...
- Methylation Sensitivity...
- Kinetics data...
- CG list...
- Cleavage of RNA/DNA Hybrids...
- Methyltransferase protein sequence lengths...
- Restriction Enzyme Molecular Weights...
- Methyltransferase Molecular Weights...
- Molecular Weights (all enzymes)...
- Enzyme sub types...
- Orphan methyltransferases...
- Methyltransferase list...
- Methyltransferase list (with subtypes)...
- Tetranucleotide palindrome methylases...
- Enzymes with alternative names...
- Growth Temperatures...
- Organism Types...
- Journal abbreviations...



REBASE Enzymes 03/31/2021

Type II restriction enzymes  
producing 5' overhangs



Length	Overhang	Enzyme	Recognition Sequence	Molecular Weight	Suppliers	Isoschizomers
4	NNNN	<a href="#">AarI</a>	CACCTGC (4/8)	-	<a href="#">B</a>	<a href="#">PacCI</a>
4	TCGA	<a href="#">AbaI</a>	CC↓TCGAGG	-	<a href="#">I</a>	-
2	MK	<a href="#">AccI</a>	GT↓MKAC	42493	<a href="#">BJKMNOX</a>	<a href="#">FbiI</a> <a href="#">XmiI</a>
4	NNNN	<a href="#">AceII</a>	CAGCTC (7/11)	-	-	-
2	CG	<a href="#">AciI</a>	CCGC (-3/-1)	60993	<a href="#">N</a>	<a href="#">BspACI</a> <a href="#">SsiI</a>
2	CG	<a href="#">AclI</a>	AA↓CGTT	37882	<a href="#">INV</a>	<a href="#">Psp1406I</a>
2	CG	<a href="#">AcyI</a>	GR↓CGYC	-	<a href="#">J</a>	<a href="#">AhaII</a> <a href="#">AosII</a> <a href="#">AstWI</a> <a href="#">AsuIII</a> <a href="#">BbiII</a> <a href="#">BsaHI</a> <a href="#">BssNI</a> <a href="#">BstACI</a> <a href="#">HgiI</a> <a href="#">HgiDI</a> <a href="#">HgiGI</a> <a href="#">HgiHII</a> <a href="#">HinII</a> <a href="#">Hsp92I</a> <a href="#">Msp17I</a> <a href="#">PamII</a>
4	TTAA	<a href="#">AflII</a>	C↓TTAAG	36774	<a href="#">JKN</a>	<a href="#">BfrI</a> <a href="#">BspTI</a> <a href="#">Bst98I</a> <a href="#">BstAFI</a> <a href="#">BstPZ740I</a> <a href="#">Esp4I</a> <a href="#">MspCI</a> <a href="#">Vha464I</a>
4	CRYG	<a href="#">AflIII</a>	A↓CRYGT	26954	<a href="#">MNS</a>	-
4	CCGG	<a href="#">AgeI</a>	A↓CCGGT	30536	<a href="#">JNR</a>	<a href="#">AsiAI</a> <a href="#">AsiGI</a> <a href="#">BshTI</a> <a href="#">CsiAI</a> <a href="#">CspAI</a> <a href="#">PinAI</a>
4	TGCA	<a href="#">ApaLI</a>	G↓TGAC	-	<a href="#">CKN</a>	<a href="#">Alw44I</a> <a href="#">SnoI</a> <a href="#">VneI</a>
4	AATT	<a href="#">ApoI</a>	R↓AATY	-	<a href="#">N</a>	<a href="#">AcsI</a> <a href="#">Cfal</a> <a href="#">FsiI</a> <a href="#">XapI</a>
4	CGCG	<a href="#">AscI</a>	GG↓CGGCC	50498	<a href="#">N</a>	<a href="#">PalAI</a> <a href="#">SgsI</a>
2	AT	<a href="#">Asi256I</a>	G↓ATC	-	-	-
4	GTAC	<a href="#">Asp718I</a>	G↓GTACC	-	<a href="#">MS</a>	<a href="#">Acc65I</a> <a href="#">AhaB8I</a> <a href="#">SthI</a>
3	GNC	<a href="#">AsuI</a>	G↓GNCC	-	-	<a href="#">AspS9I</a> <a href="#">AvcI</a> <a href="#">Bac36I</a> <a href="#">Bal228I</a> <a href="#">BavAII</a> <a href="#">BavBII</a> <a href="#">Bce22I</a> <a href="#">BmgT120I</a> <a href="#">BshKI</a> <a href="#">BsiZI</a> <a href="#">Bsp1894I</a> <a href="#">BspBII</a> <a href="#">BspF4I</a> <a href="#">Bsu54I</a> <a href="#">CcuI</a> <a href="#">Cfr13I</a> <a href="#">MaeK81II</a> <a href="#">NspIV</a> <a href="#">Nsp712II</a> <a href="#">Pde12I</a> <a href="#">PspPI</a> <a href="#">Sau96I</a>
2	CG	<a href="#">AsuII</a>	TT↓CGAA	-	<a href="#">C</a>	<a href="#">AcpI</a> <a href="#">Asp10HI</a> <a href="#">BimI</a> <a href="#">Bim19I</a> <a href="#">Bpu14I</a> <a href="#">BsiCI</a> <a href="#">Bsp119I</a> <a href="#">BspLAI</a> <a href="#">BspT104I</a> <a href="#">BstBI</a> <a href="#">CbiI</a> <a href="#">Csp45I</a> <a href="#">Csp68KII</a> <a href="#">EspII</a> <a href="#">LspI</a> <a href="#">MlaI</a> <a href="#">NspV</a> <a href="#">PlaII</a> <a href="#">PpaAI</a> <a href="#">SfuI</a> <a href="#">Ssp1I</a> <a href="#">SspRFI</a> <a href="#">SviI</a>
4	YCGR	<a href="#">AvaI</a>	C↓YCGRG	35676	<a href="#">JNQX</a>	<a href="#">Ama87I</a> <a href="#">ApuI</a> <a href="#">BcoI</a> <a href="#">BmeT110I</a> <a href="#">Bse15I</a> <a href="#">BsiHKCI</a> <a href="#">BsoBI</a> <a href="#">BspLU4I</a> <a href="#">BstSI</a> <a href="#">Eco88I</a> <a href="#">Eco27kI</a> <a href="#">NspIII</a> <a href="#">NspSAI</a> <a href="#">OfoI</a> <a href="#">PlaAI</a> <a href="#">PunAI</a>
3	GWC	<a href="#">AvaII</a>	G↓GWCC	26127	<a href="#">JNX</a>	<a href="#">AflI</a> <a href="#">Asp745I</a> <a href="#">BamNII</a> <a href="#">BcuAI</a> <a href="#">Bme18I</a> <a href="#">Bme216I</a> <a href="#">BmpI</a> <a href="#">BsrAI</a> <a href="#">BthAI</a> <a href="#">Caul</a> <a href="#">Csp68KI</a> <a href="#">DsaIV</a> <a href="#">EagMI</a> <a href="#">Eco47I</a> <a href="#">ErpI</a> <a href="#">FdiI</a> <a href="#">EspMSI</a> <a href="#">FsslI</a> <a href="#">HgiBI</a> <a href="#">HgiCII</a> <a href="#">HgiEI</a> <a href="#">HgiHIII</a> <a href="#">HgiJ</a> <a href="#">Kzo49I</a> <a href="#">MspNI</a> <a href="#">SinI</a> <a href="#">SnuEI</a> <a href="#">VpaK11BI</a>
4	CTAG	<a href="#">AvtII</a>	C↓CTAGG	-	<a href="#">N</a>	<a href="#">Acp2I</a> <a href="#">AvtBII</a> <a href="#">BinI</a> <a href="#">BspA2I</a> <a href="#">XmaJI</a>
4	GATC	<a href="#">BamHI</a>	G↓GATCC	24569	<a href="#">BCIJKMNQRSVXY</a>	<a href="#">AccEBI</a> <a href="#">AliI</a> <a href="#">ApaCI</a> <a href="#">AsiI</a> <a href="#">Bce75I</a> <a href="#">BnaI</a> <a href="#">Bsp98I</a> <a href="#">Bsp4009I</a> <a href="#">BspAAIII</a> <a href="#">BstI</a> <a href="#">Cell</a> <a href="#">GstI</a> <a href="#">Mlu23I</a> <a href="#">Nsp29132II</a> <a href="#">NspSAIV</a> <a href="#">OkraI</a> <a href="#">Pfi8I</a> <a href="#">RspLkII</a> <a href="#">Soll</a> <a href="#">Surl</a> <a href="#">Uba4009I</a>
4	NNNN	<a href="#">BbvI</a>	GCAGC (8/12)	61734	<a href="#">N</a>	<a href="#">AlwXI</a> <a href="#">BseKI</a> <a href="#">BseXI</a> <a href="#">Bsp423I</a> <a href="#">Bst12I</a> <a href="#">Bst7I</a> <a href="#">BstV1I</a> <a href="#">GeoICI</a> <a href="#">Lsp1109I</a>
4	NNNN	<a href="#">BbvII</a>	GAAGAC (2/6)	-	-	<a href="#">Bbr7I</a> <a href="#">BbsI</a> <a href="#">Bbv16II</a> <a href="#">BpiI</a> <a href="#">BpuAI</a> <a href="#">Bsc9I</a> <a href="#">BspBS3I</a> <a href="#">BspIS4I</a> <a href="#">BspTS514I</a> <a href="#">BstBS32I</a> <a href="#">BstTS5I</a> <a href="#">BstV2I</a>
3	TCA	<a href="#">BbvCI</a>	CCTCAGC (-5/-2)	32615	<a href="#">N</a>	<a href="#">AbeI</a>

# REBASE – příklad záznamu



GOLD STANDARD

## EcoRI

Type II restriction enzyme  
subtype: P

Different enzyme:

Go

Recognition Sequence: [help?](#)

G<sup>^</sup>AATTC



REBASE Enz Num 993 entered Jan 1 1972 ... modified Jul 3 2014

Acronym: [EcoR](#)

Prototype: EcoRI

Org #: [1394](#)

Organism: [Escherichia coli RY13](#)

Organism type: [plasmid](#)

Organism source: [R.N. Yoshimori](#)

Growth Temperature: 37 °

Experimental Evidence: [biochemistry](#)

Exhibits star activity

Single-stranded cleavage: y

Enzyme gene cloned

Enzyme gene sequenced

Crystal data present

[Kinetics data present](#)

Molecular Weight: 31057

# sites on

*Adeno2*: 5

*Lambda*: 5

*pBR322*: 1

*PhiX174*: 0

*SV40*: 1

[Status of methylation sensitivity testing...](#)

[Site frequency in sequenced genomes...](#)

[DNA RNA hybrids...](#)

[RNA duplexes...](#)

[Single stranded DNA...](#)

[Combined report...](#)

Related Enzymes:

[M.EcoRI](#)

Related References

[sorted by date](#) [in new window](#)

[sorted by authors](#) [in new window](#)

[Commercially Available...](#)

[NEB EcoRI-HF](#)

[Similar enzymes...](#)

Sequence Data:

[EcoRI](#)

[Crystal Data...](#) (8 structures)

[Kinetic Data...](#) (5 records)

[Methylation Sensitivity...](#)

# New England Biolabs – Restrikční enzymy

- Dodavatel řady RE
- Užitečné **nástroje** na webových stránkách

NEW ENGLAND BioLabs Inc. be INSPIRED drive DISCOVERY stay GENUINE Applications & Products Tools & Resources Support About

Home > Tools & Resources > Selection Charts > Alphabetized List of Recognition Specificities

## Alphabetized List of Recognition Specificities

All restriction endonuclease recognition specificities available from New England Biolabs are listed below. For enzymes that recognize non-palindromic sequences, the complementary sequence of each strand is listed. For example, CCTC(7/6) and (6/7)GAGG both represent an MnlI (NEB #R0163) site.

All recognition sequences are written 5' to 3' using the **single letter code** nomenclature with the point of cleavage indicated by a "/>. Numbers in parentheses indicate point of cleavage for non-palindromic enzymes.

For example, GGTCTC(1/5) indicates cleavage at:  
5' ...GGTCTCN/...3'  
3' ...CCAGAGNNNN/...5'









Recognition Sequence
AA/CGTT
A/AGCTT
AAT/ATT
/AATT
A/CATGT
A/CCGGT
ACCTGC(4/8)
A/CCWGGT

NEW ENGLAND BioLabs Inc. be INSPIRED drive DISCOVERY stay GENUINE Applications & Products Tools & Resources Support About

Home > Tools & Resources > Interactive Tools

## Interactive Tools

### NEB Tools

-  **Competitor Cross-Reference Tools**  
Use this tool to select another company's product and find out which NEB product is compatible. Choose either the competitor's product name or catalog number from the available selections, and this tool will identify the recommended NEB product.
-  **Double Digest Finder**  
Use this tool to guide your reaction buffer selection when setting up double-digests, a common timesaving procedure. Choosing the right buffers will help you to avoid star activity and loss of product.
-  **Exo Selector**  
Use this tool to simplify the process of selecting the appropriate exonucleases for use in your nucleic acid digestion workflows. The tool guides you to product recommendations based on your answers to a few simple questions.
-  **NEB Golden Gate Assembly Tool**  
Use this tool to assist with in silico DNA construct design for Golden Gate DNA assembly. It enables the accurate design of primers with appropriate type IIS restriction sites and overlaps, quick import of sequences in many formats and export of the final assembly, primers and settings.
-  **DNA Sequences and Maps Tool**  
Use this tool to find the nucleotide sequence files for commonly used molecular biology tools, including plasmid, viral and bacteriophage vectors.
-  **Enzyme Finder**  
Use this tool to select restriction enzymes by name, sequence, overhang or type. Enter your sequence using single letter code nomenclature, and Enzyme Finder will identify the right enzyme for the job.
-  **Glycan Analyzer**  
Use this tool to interpret Ultra or High Pressure liquid chromatography (UPLC/HPLC) N-glycan profiles following exoglycosidase digestions.
-  **NEBaseChanger**  
NEBaseChanger can be used to design primers specific to the mutagenesis experiment you are performing using the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit. This tool will also calculate a recommended custom annealing temperature based on the sequence of the primers by taking into account any mismatches.

# New England Biolabs – NEBcutter

- Tvorba restrikčních map
- Detailní analýza restrikčních míst

NEBcutter®  
version 3.0.15

WELCOME GUEST, SIGN IN

Open Recent Project  
Projects will be automatically deleted 7 day(s) after they were last accessed.

Disable cookies

Enter a DNA sequence, or select from other options, to identify cut sites. Once you submit a sequence, you may choose to customize your digest.

1. Input or choose sequence. ⓘ

Text File GenBank Plasmid Vector Viral & Phage

Type or paste sequence

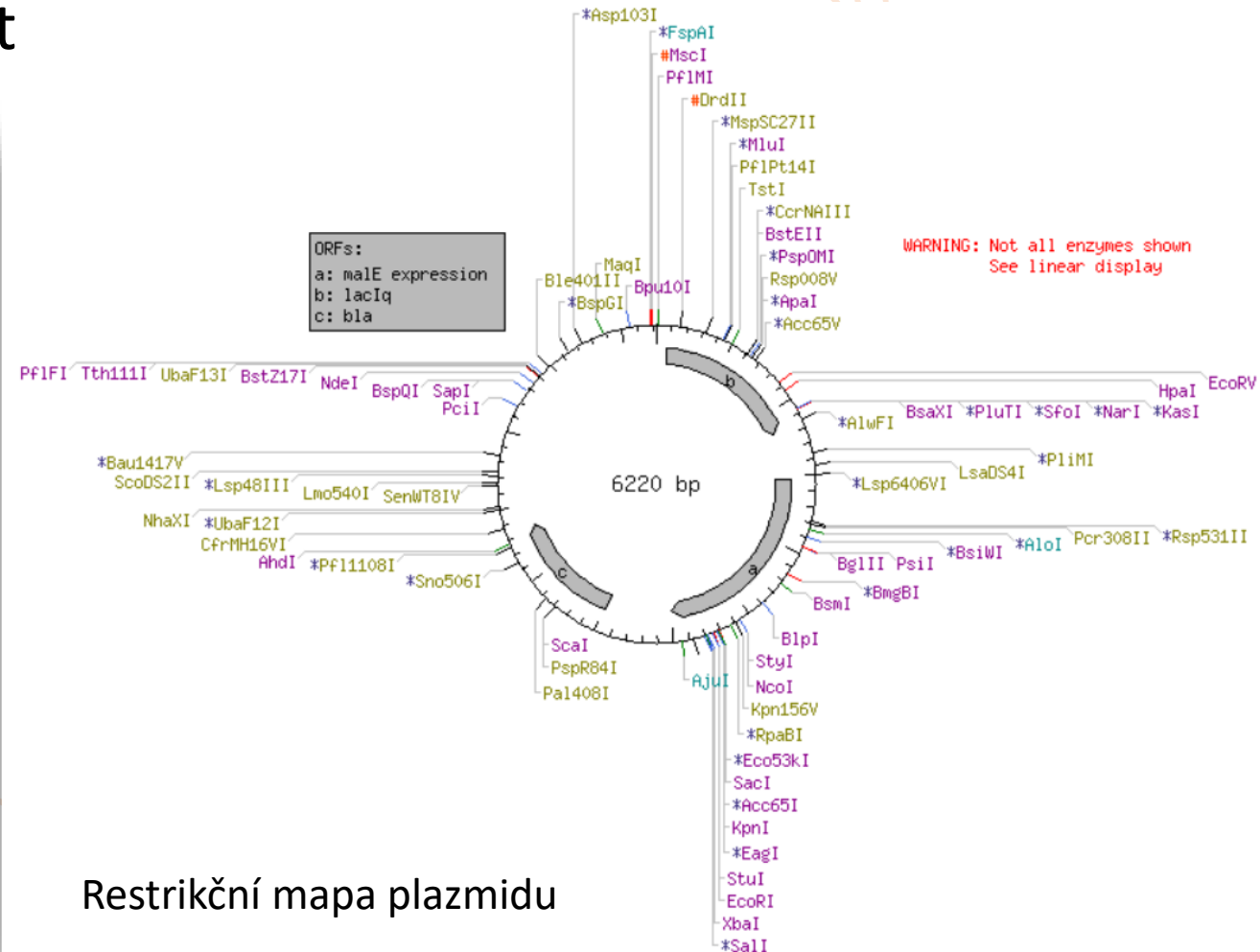
2. Set preferences. ⓘ

Circular Additional Preferences (enzymes, oligos, etc)

3. Name project (optional). ⓘ

Enter project name

Submit



NCBR – Masaryk University

C2131 Úvod do bioinformatiky

C2131 Úvod do bioinformatiky

# Primery

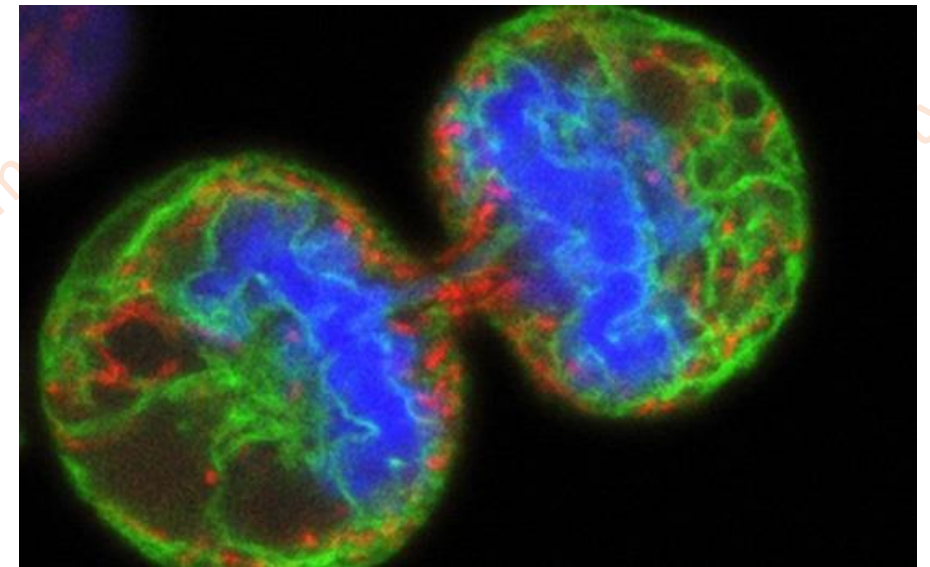
C2131 Úvod do bioinformatiky

C2131 Úvod do bioinformatiky

NCBR – Masaryk University

# Replikace DNA

- Aby se mohla buňka dělit, je nutné vytvořit kopii její DNA
- Podobně je nutné zkopírovat i DNA případných organel (mitochondrie, plastidy)
- Celý proces je komplexní, vyžaduje přísun stavebního materiálu, energie a podílí se na něm řada enzymů

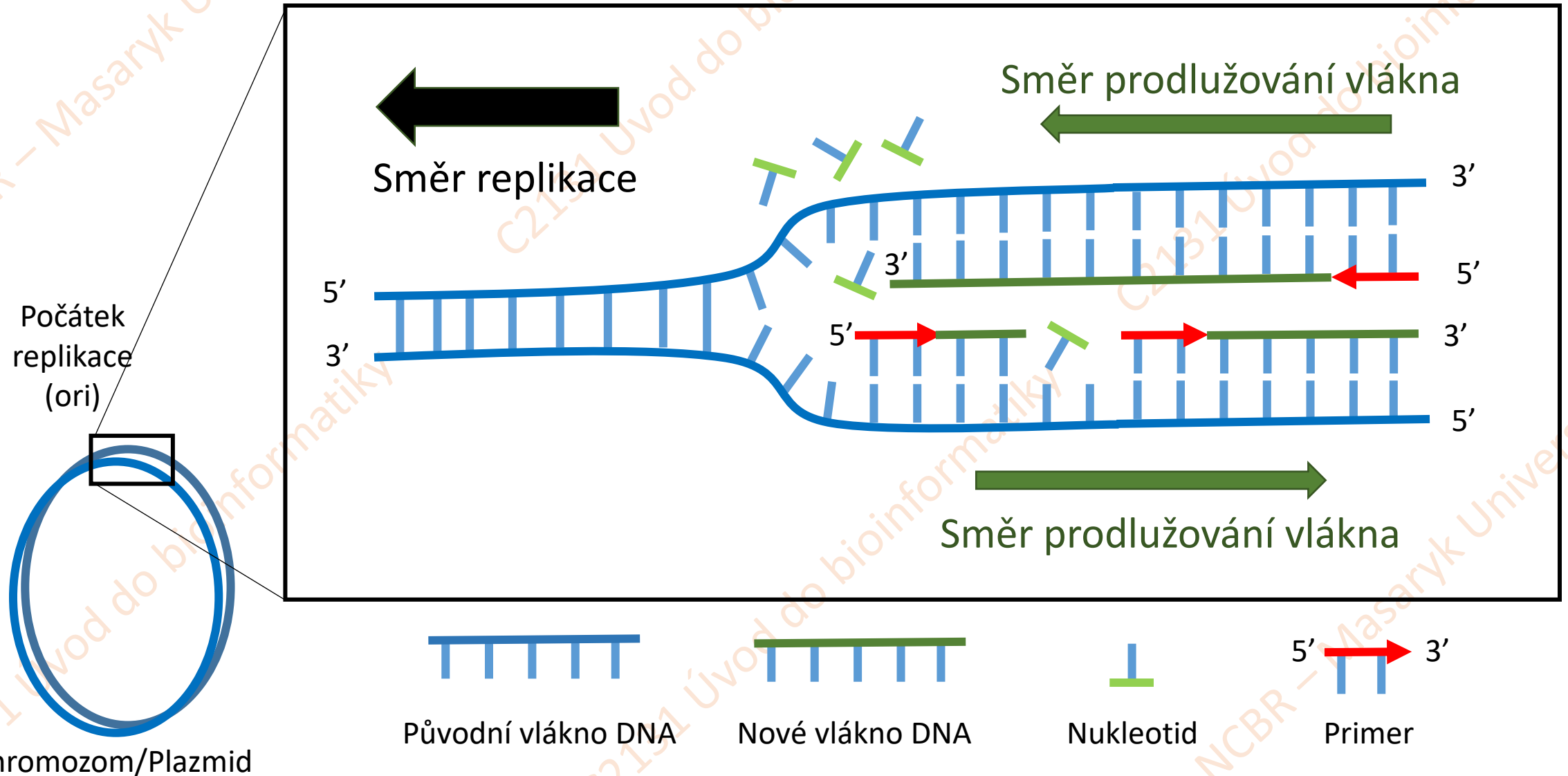


# Replikace DNA

- DNA je dvouvláknová – je nutno ji „rozplést“
- Na základě párování bází je ke každému vlákně doplněno vlákno komplementární
- Syntéza nového vlákna probíhá VŽDY ve směru **5'→3'**. To znamená, že:
  - Jedno vlákno je syntetizováno nepřetržitě
  - Druhé vlákno je syntetizováno „v protisměru“ po krátkých úsecích (tzv. Okazakiho fragmenty)
- Syntéza každého úseku DNA začíná krátkým oligonukleotidem zvaným

**PRIMER**

# Replikace DNA – Schéma



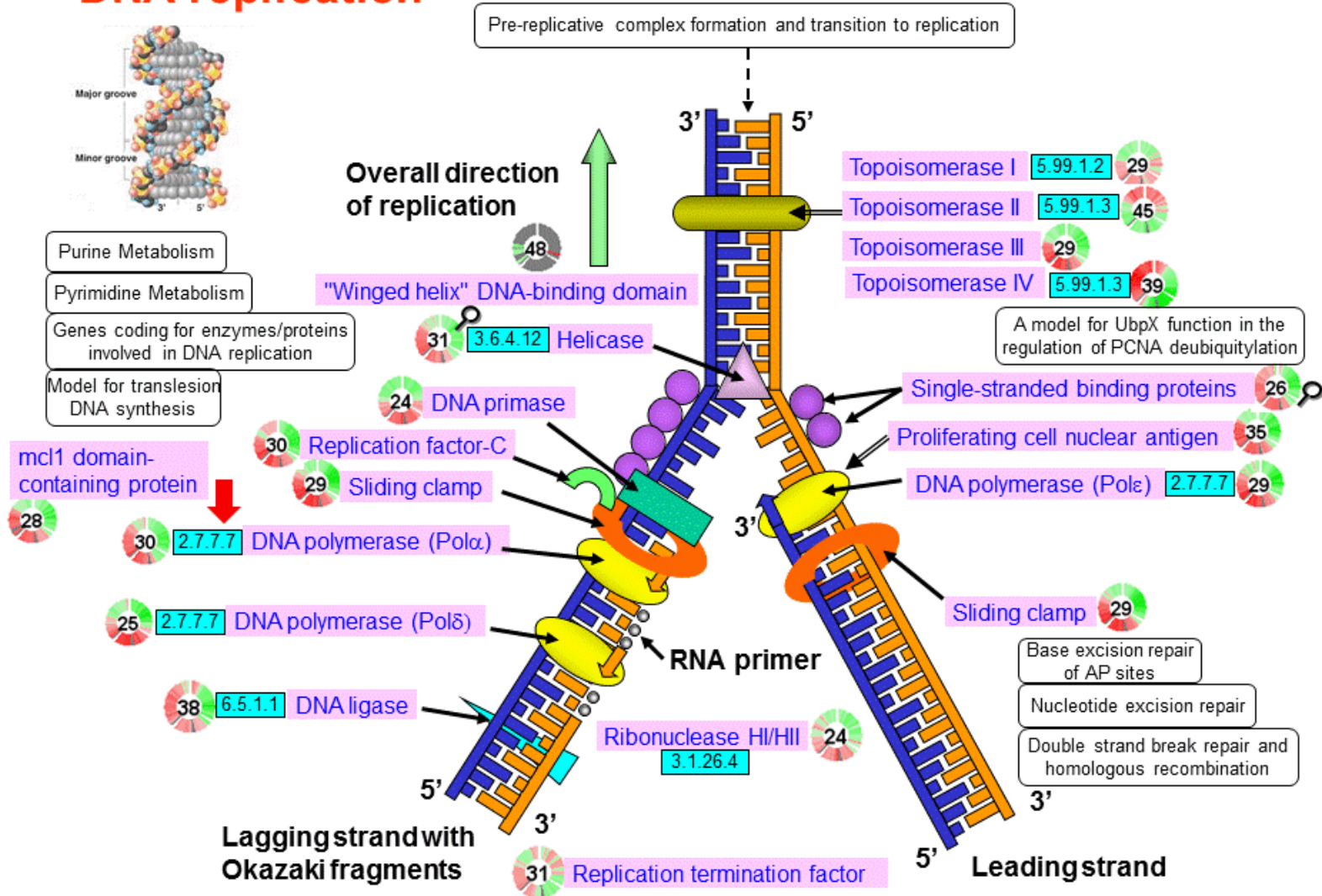


# Replikace DNA

• Na procesu se podílí řada proteinů:

- DNA polymerasa
- Primasa
- Ligasa
- Topoisomerasa
- „Svorky“
- Replikační faktory
- ...

## DNA replication



# Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Replikace DNA *in vitro* (ve zkumavce)
- Využívá **DNA polymerasu z termofilních organismů** – je stabilní a aktivní při vysoké teplotě
- Je založena na vícenásobném opakování cyklu:
  - Rozvolnění DNA (*denaturing*)
  - Nasednutí primerů (*annealing*)
  - Syntéza komplementárního vlákna (*extending*)

# Polymerázová řetězová reakce



Vstupní (templátová) DNA

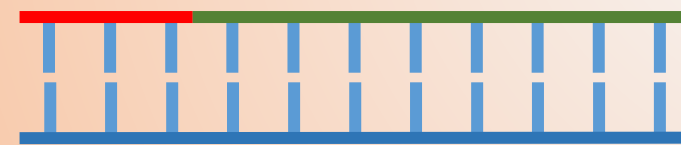
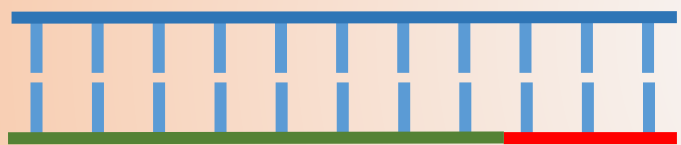
Tepelná  
denaturace

95°C



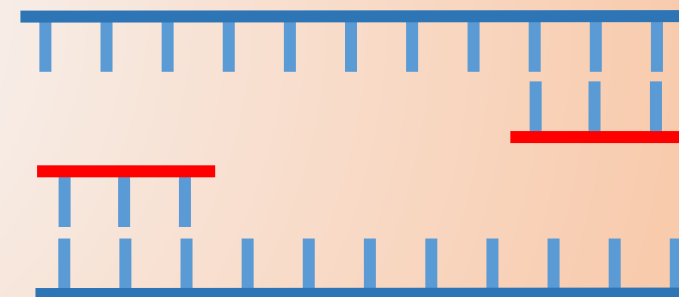
Nasednutí  
primerů  
(annealing)

45-60°C



72°C

Syntéza DNA  
(extending)



C2131 Úvo

NCBR - Masaryk University

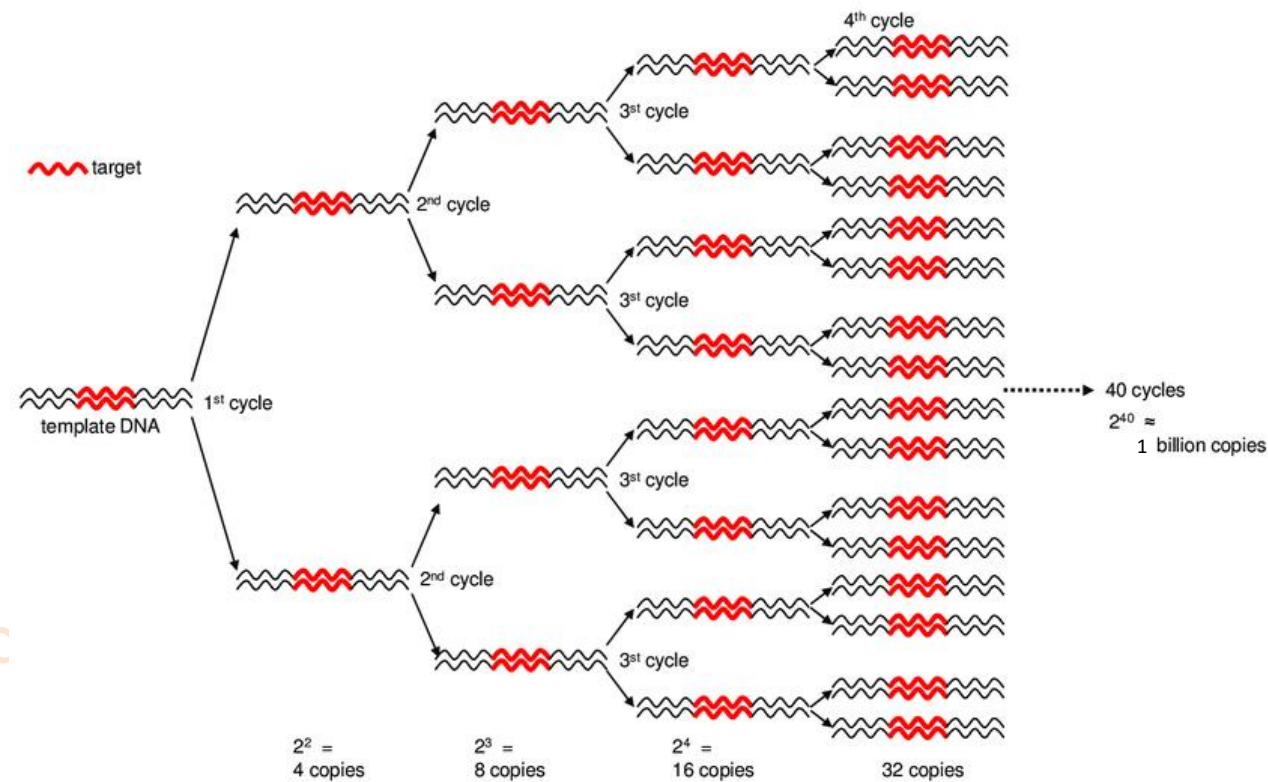
od do bioinformatiky

od do bioinformatiky

NCBR - Masaryk University

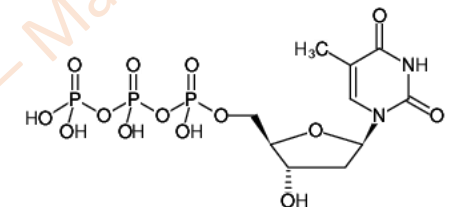
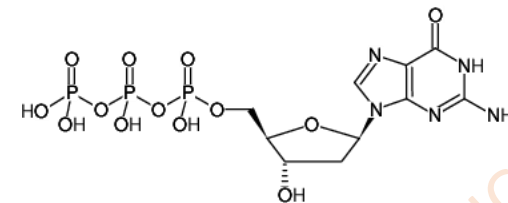
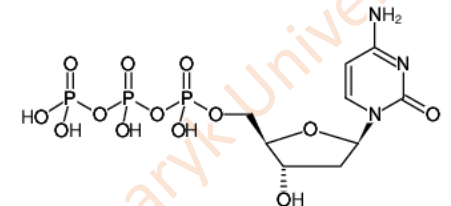
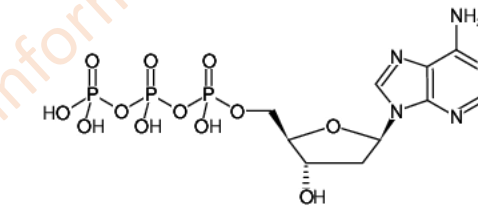
# Polymerázová řetězová reakce

- Počet molekul DNA vzrůstá (teoreticky) s druhou mocninou
  - Po prvním cyklu – 2 molekuly
  - Po druhém cyklu – 4 molekuly
  - Po třetím cyklu – 8 molekul
  - ...
  - Po 25. cyklu – 33,5 mil. molekul
  - Po n-tém cyklu –  **$2^n$  molekul**



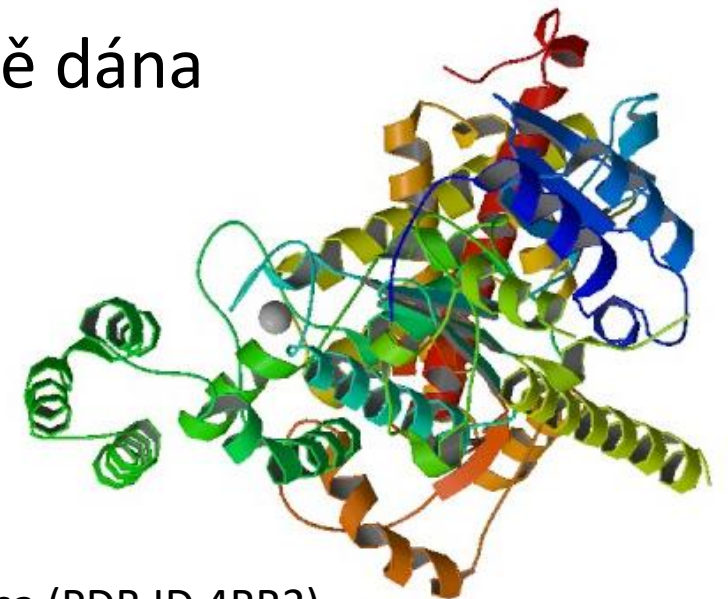
# Komponenty PCR

- **Templátová DNA**
- **Termostabilní DNA polymerasa**
- **Primery** – krátké DNA nebo RNA oligonukleotidy
- **Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP)** – stavební materiál a zároveň zdroj energie
- **Mg<sup>2+</sup> ionty** – kofaktory pro enzymy
- **Vhodné prostředí** – pH, iontová síla



# Tvorba primerů v organismu

- Organismy používají **RNA primery**
- Syntetizovány DNA-dependentní-RNA-polymerasou (primasou)
- Pozice primerů (a tedy jejich sekvence) není striktně dána
- **Během replikace** jsou následně **odbourány** a nahrazeny DNA



Lidská primasa (PDB ID 4RR2)

# Umělá syntéza primerů

- **Syntetické primery** je možno vytvořit jako RNA i DNA primery
- **DNA primery** jsou stabilnější a používají se častěji
- Syntetické primery lze použít k:
  - Replikaci DNA *in vitro*
  - Vložení mutace do DNA – substituce, delece, inserce
  - Vložení nestandardní báze – např. značené (fluorescenčně, izotopově)

# Design primeru

- Syntetické primery mají **definovanou sekvenci**
- Konkrétní sekvence primeru je závislá na účelu použití
- Nejjednodušší **aplikace** – tvorba kopií žádaného úseku DNA
  - Primery jsou zcela komplementární k začátku a konci sekvence
  - Tzn. primery mají stejnou sekvenci jako vlákno v orientaci 5'→3'
- Pro speciální aplikace se může sekvence primeru a DNA lišit !



# Parametry primeru

- U každého primeru (resp. každého oligonukleotidu) lze definovat několik parametrů
- **Parametry jsou dané zejména sekvencí primeru** (a částečně podmínkami)
  - Délka primeru (počet bazí/nukleotidů)
  - Obsah guaninu a cytosinu (G+C) v sekvenci primeru
  - Teplota „tání“ ( $T_m$ )
  - Tendence k tvorbě sekundárních struktur
  - Specifita nasednutí

# Délka primeru

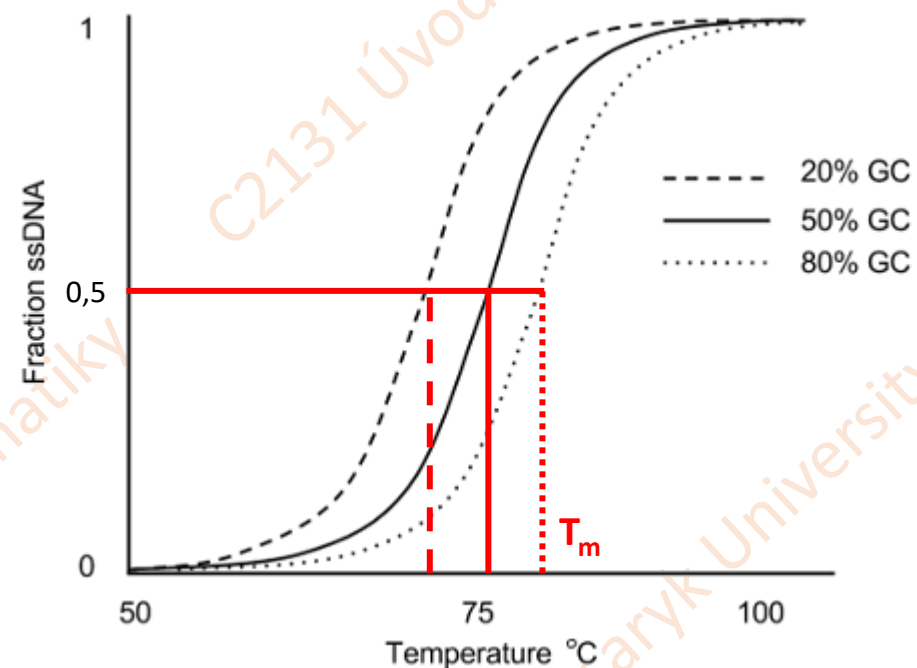
- Běžné primery mají délku **17-28 bp** (*base pairs* = párů bazí)
- Délka primeru má vliv na ostatní parametry ( $T_m$ , specifita)
- **Krátké** primery mají nižší specifitu (viz dále), jsou „univerzálnější“
- **Dlouhé** primery (až 40+ bp) se používají zejména pro cílené modifikace DNA

# Obsah G+C bází v primeru

- Typické primery jsou tvořeny čtyřmi základními bázemi (A, C, G, T pro DNA, příp. A, C, G, U pro RNA)
- Vzhledem k tomu, že při kanonickém párování se guanin vždy páruje s cytosinem, obsah G+C v primeru (jednom vláknu DNA) odpovídá i obsahu G+C ve dvouvláknové DNA
- Logicky pak platí, že:  $(\text{obsah G+C [\%]}) = 100 - (\text{obsah A+T [\%]})$
- **Vyšší obsah G+C** znamená vyšší **stabilitu** při párování bází

# Teplota tání primeru

- Každý oligonukleotid (tedy i primer) je schopen se párovat se svým komplementárním vláknem (tvoří tzv. duplex)
- **Stabilita** duplexu je závislá na délce primeru, sekvenci (obsahu G+C), **teplotě** a iontové síle prostředí
- Stabilita klesá s rostoucí teplotou – duplex se snáze rozpadá
- **Teplota tání primeru ( $T_m$ )** je teplota, při níž je právě polovina molekul primeru volná a polovina vázaná v duplexu



Upraveno z [www.khanacademy.org](http://www.khanacademy.org)

# Teplota tání primeru

- $T_m$  lze stanovit experimentálně, častěji je však odhadována **výpočtem**
- Pro určení  $T_m$  se používají různé vzorce. Např.

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = \frac{\Delta H^0}{\Delta S^0 + R \times \ln c_p} - 273,15$$

kde  $\Delta H^0$  je entalpie tání,  $\Delta S^0$  je entropie tání,  $R$  je molární plynová konstanta,  $c_p$  je koncentrace primeru

Výpočet může zahrnovat také **efekt iontové síly** roztoku. Např.

$$T_m \text{ (corrected)} = \frac{1}{\frac{1}{T_m} + \left[ (4.29 \cdot f_{gc} - 3.95) \cdot \ln(m) + 0.94 \cdot (\ln(m))^2 \right] \cdot 10^{-5}}$$

kde  $T_m$  je teplota tání dle předchozího vztahu,  $f_{gc}$  je zastoupení G+C bází,  $m$  je koncentrace monovalentních iontů

# Teplota tání primeru

- V rámci PCR je nutné aby primery opakovaně nasedaly na templátovou DNA
- **Typická  $T_m$**  používaných primerů se pohybuje v rozmezí 50 – 65°C
- Zároveň je potřeba, aby se oba použité primery chovaly podobně – fungují zároveň v jedné reakční směsi
- **Rozdíl  $T_m$  obou primerů** by měl být ideálně menší než 2°C

# Sekundární struktury primeru

- Jako každá nukleová kyselina, i primery mohou tvořit sekundární struktury
- V případě primerů jsme schopni rozlišit:
  - **Vlásenky**
  - **Dimery**
- Pro účely PCR je tvorba sekundárních struktur u primeru **nežádoucí**
- Při analýze sekundárních struktur nás obvykle zajímá ta nejstabilnější

# Sekundární struktury – dimerizace

- Pokud se v rámci primeru nachází vzájemně komplementární sekvence (v podstatě obsahují palindrom), mohou molekuly tvořit tzv. **homodimer**

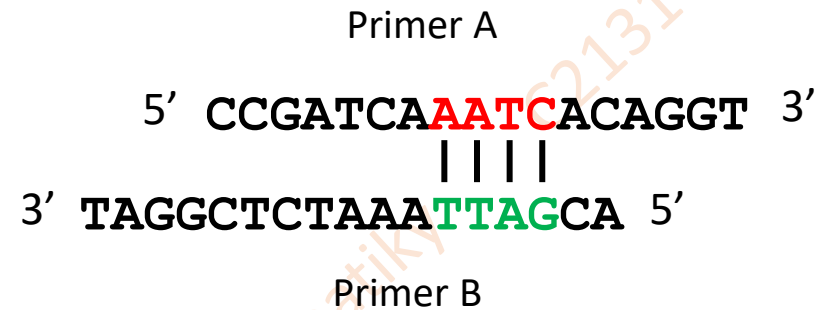
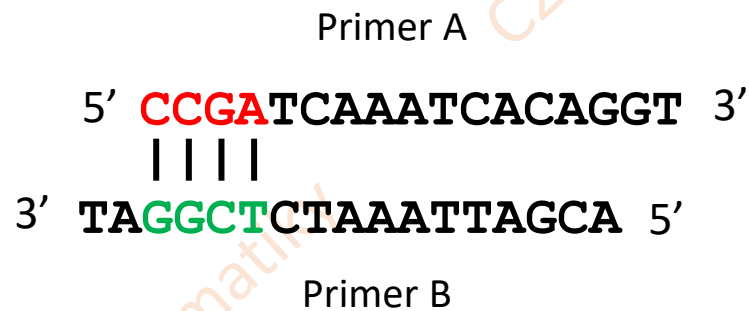


- **Stabilita dimeru** je dána teplotou tání komplementárního úseku
- V extrémním případě může dimer tvořit celý primer
- Úseky kratší než 4 nukleotidy jsou málo stabilní



# Sekundární struktury – dimerizace

- Při PCR používáme typicky dvojici primerů. Pokud jsou navzájem komplementární části v jednom a druhém z nich, mohou tvořit tzv. **heterodimer**

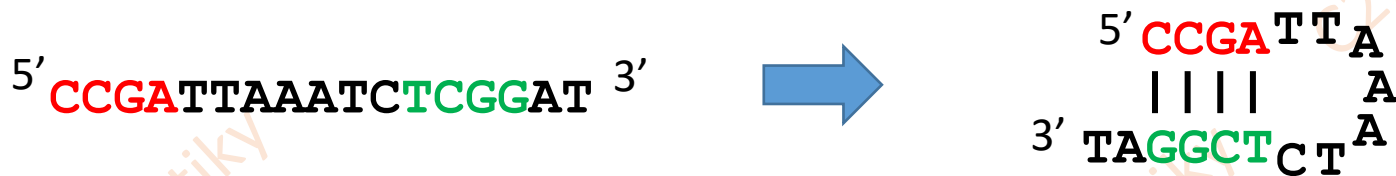


- Pro stabilitu heterodimeru platí totéž, co pro homodimer.
- Někdy může vznikat několik různých dimerů

# Sekundární struktury – vlásenky



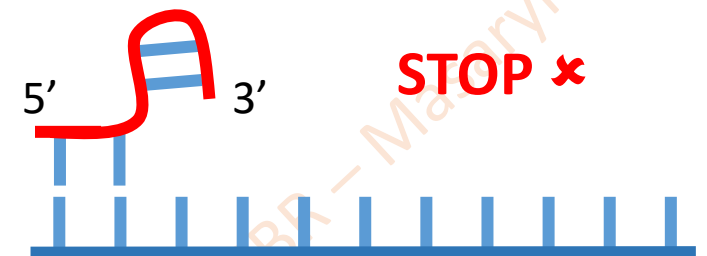
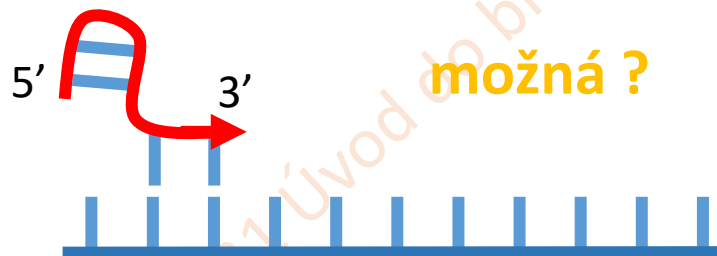
- Pokud se vzájemně komplementární sekvence v rámci primeru nachází ve vhodné orientaci (nepřekrývají se), mohou molekuly tvořit **vlásenky**



- Stabilita vlásenek je dána teplotou tání komplementárního úseku a velikostí vlásenky
- Příliš malé (< 3 nt) a příliš velké vlásenky nejsou příliš stabilní

# Sekundární struktury

- Tvorba sekundárních struktur DNA je vratná – systém se nachází v rovnováze, **zastoupení sekundární struktury závisí na podmínkách**
- Sekundární struktury brání nasedání primeru na templátovou DNA
- Obzvláště **nevhodná** je tvorba sekundárních struktur na **3' konci** primeru – blokují prodlužování primeru = syntéza DNA neprobíhá

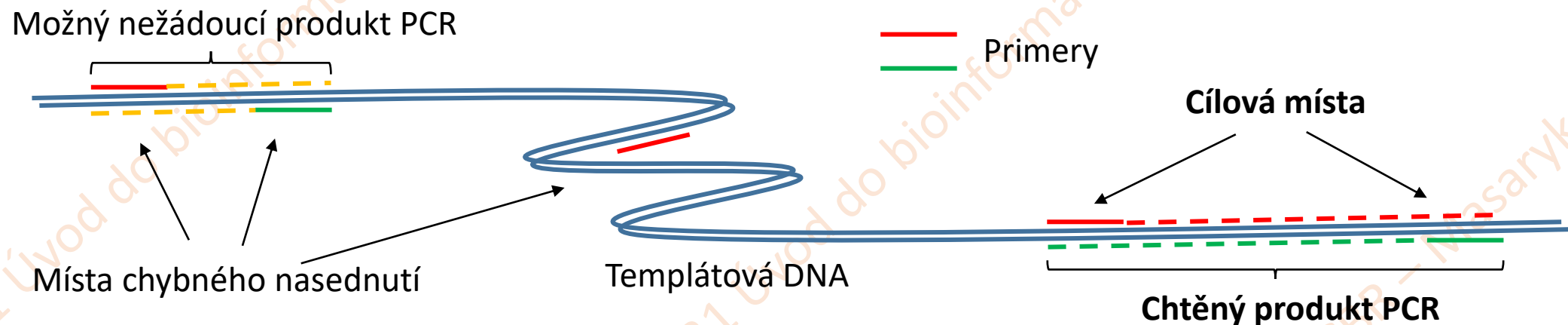


# Specifita primeru

- Primer většinou cílíme na konkrétní místo na DNA
- Templátová DNA je většinou výrazně delší než cílová sekvence
- Sekvence je volena tak, aby možnost nasednutí na jiné než požadované místo byla co nejmenší
  - Prodloužení primeru zvyšuje specifitu
  - Posun cílové sekvence primeru vpřed/vzad, je-li to možné
  - Snaha nezařazovat na 3 konec G+C bohatou sekvenci
- Pokud je známa sekvence vstupní DNA (plazmid, genom), je vhodné otestovat možná místa „falešného nasedání primeru“ (***false priming sites***)

# Specifita primeru – false priming sites

- Nasednutí na nežádoucí místa snižuje množství primerů pro požadovanou reakci
- V případě nežádoucího nasednutí dvou primerů v blízké oblasti může dojít k tvorbě **nežádoucích produktů**



# Design primeru – obecné parametry

**Optimální parametry** pro namnožení kopií požadovaného úseku DNA

- Délka primeru: 17 – 28 bp
- Obsah G+C: 40 – 60 %
- Teplota tání  $T_m$  jednotlivých primerů: 50 – 65°C
- Rozdíl  $T_m$  levého a pravého primeru: < 2°C
- Sekundární struktury na 3' konci: žádné
- Sekundární struktury: žádné nebo nestabilní
- Možná místa chybného nasedání: žádná

# Design primeru – namnožení úseku

Potřebujeme-li **namnožit** konkrétní úsek DNA (např. gen):

- Začátek a konec sekvence je striktně daný – pozici primerů lze měnit jen omezeně

Možný rozsah pozic levého primeru



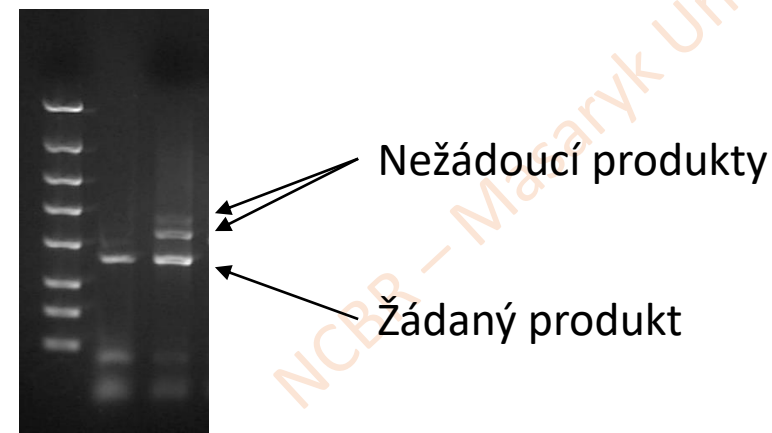
Cílový úsek

```
...TTCCCCGCGGATGCCTACCGCTCGGGGAACATCGACATCTCTGTGTTCTTCCAAGCTAGCGGCGTCTCCTTGCAGCAGTTGGTCCATCACGGTTGGATGAATGGATCTCCGGCAC...  
...AAGGGGGCGCCTACGGATGGCGAGCCCCTTGTAGCTGTAGAGACACAAGAAGGTTTCGATCGCCGCAGAGGAACGTCGTCAACCAGGTAGTGCCAACCTACTTACCTAGAGGCCGTG...
```



Možný rozsah pozic pravého primeru

- Špatné nasednutí primerů není žádoucí ale nemusí být kritické – případné nežádoucí produkty lze často odseparovat



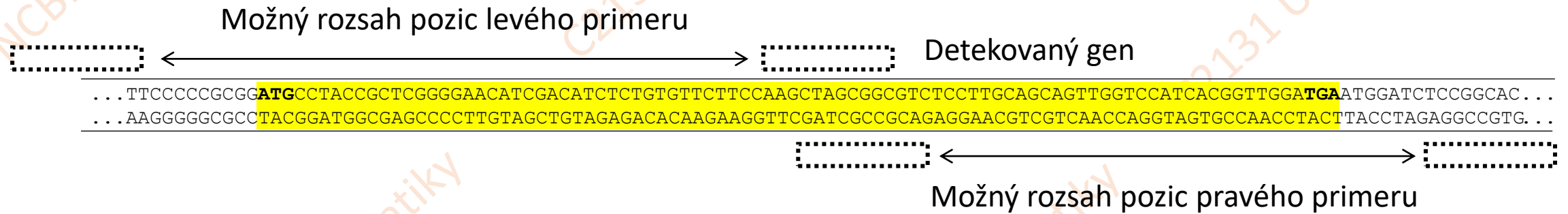
Nežádoucí produkty

Žádaný produkt

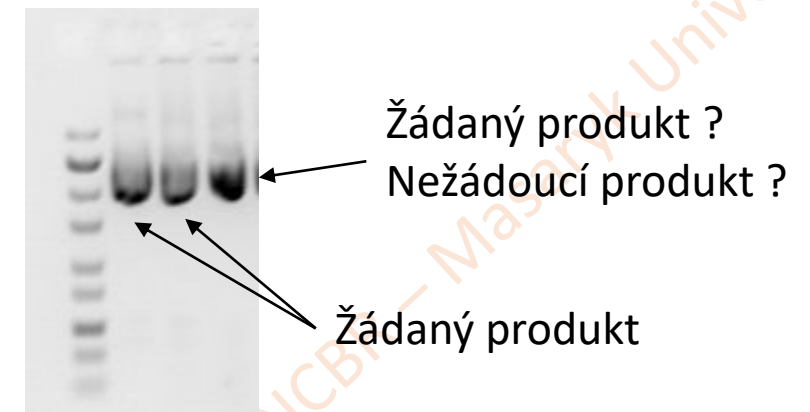
# Design primeru – detekce genu

Je-li cílem **určit**, zda je či není **přítomen** gen (varianta genu):

- Primery mohou nasedat jak uvnitř genu tak vně – velká variabilita



- Možné nežádoucí produkty jsou rizikové – možnost falešně pozitivních výsledků



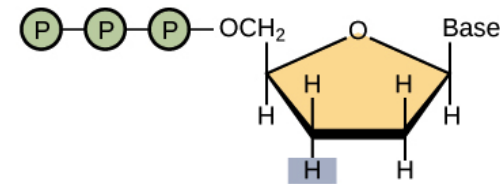


# Možnosti modifikace primerů – aplikace

Velké množství různých aplikací. Např.:

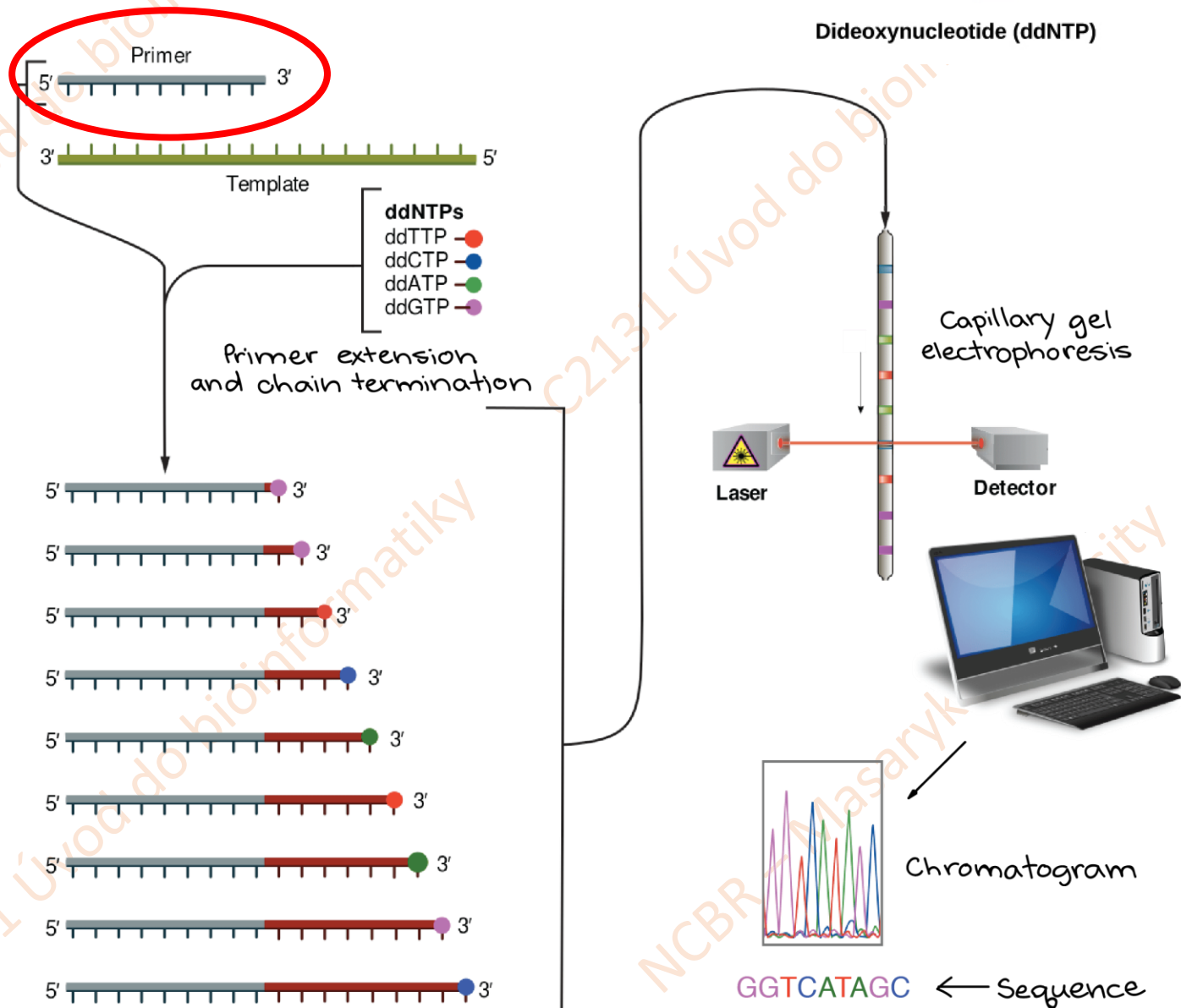
- **Sekvence DNA** – použití jediného primeru
- **Mutageneze** – použití primeru se změněnou sekvencí
- **Modifikace množené DNA** – primery z několika částí z nichž jedna je komplementární k templátové DNA, zatímco zbytek má jinou funkci (např. usnadňuje vložení namnoženého genu do cílové molekuly DNA nebo ukotvení na povrch)

# Sekvenace nukleových kyselin



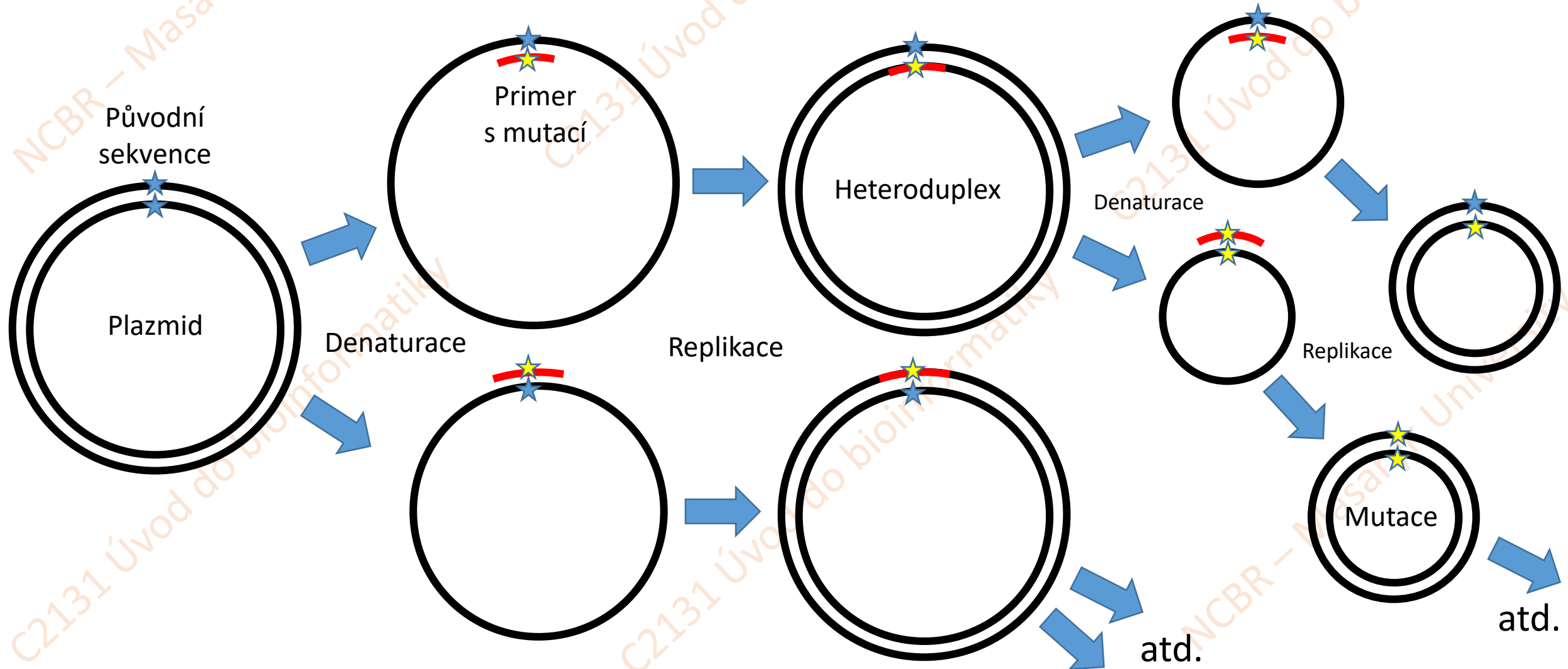
## Sangerova sekvenace

- Zavedena 1977
- PCR syntéza řetězce DNA s náhodným vložením značených dideoxynukleotidů
- Separace produktů pomocí gelové elektroforézy



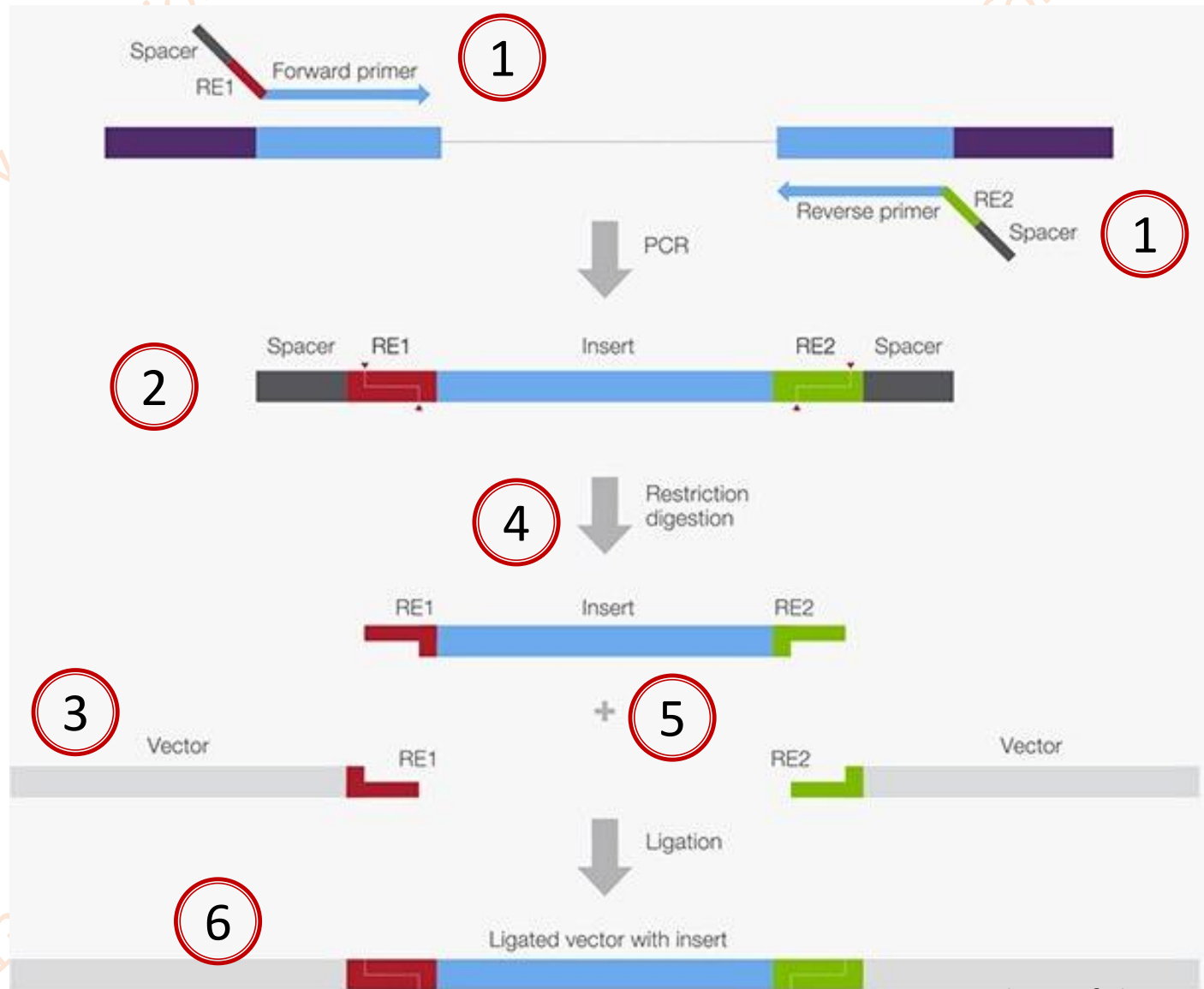
# Mutageneze pomocí PCR

Dvojice primerů s vloženou mutací + plazmid nesoucí cílovou sekvencí



# Modifikace DNA – schéma klonování

1. Primery obsahují kromě komplementární sekvence ještě sekvenci pro restriční enzym
2. Vložení restričních míst na okraj genu pomocí PCR
3. Upravený plazmid (vektor) se stejnými restričními místy
4. Štěpení produktu PCR a cílového plazmidu pomocí restričních endonukleas
5. Smíchání naštěpených molekul DNA
6. Spojení (ligace) plazmidu a genu



# SW nástroje pro design primeru

Navržení dobrých primerů je náročné – často se proto používají **bioinformatické nástroje**

- Placené – většinou součástí komplexních programů
- Omezeně dostupné (registrace)
- Volně dostupné – poměrně velké množství, různé aplikace

# Oligo Analysis

<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/>

- Jednoduchá analýza základních parametrů oligonukleotidů (primerů)

OLIGO ANALYSIS TOOL

Specify name and sequence of the oligo you would like to analyse.

**Oligo Information**

Type: DNA

Name: primer\_left

Sequence: CCGATCAAATCACAGGTCA

Length: 19 mer MW: 5765.79 [g/mol]

Properties: OD Calc | Dilution Calc | Self-Dimer Check | PCR Check

Calculate the physical properties like GC content, T<sub>m</sub> and extinction coefficient of your oligo sequence as well as reverse and complement sequences.

**Analyse**

Calculate

**Result**

Sequence (5' -> 3'):	CCG ATC AAA TCA CAG GTC A
Reverse complement (5' -> 3'):	TGA CCT GTG ATT TGA TCG C
Reverse sequence (5' -> 3'):	ACT GGA CAC TAA ACT AGC C
Complement sequence (5' -> 3'):	GGC TAG TTT AGT GTC CAG T
Base composition:	A x 7, C x 6, G x 3, T x 3, U x 0, Wobbles x 0
GC content [%]:	47.4 %
Melting temperature [°C]:	54.5 °C
Extinction coefficient:	213,500.00 L x mol <sup>-1</sup> x cm <sup>-1</sup>

Velikost

G+C obsah

T<sub>m</sub>

Homodimer

OLIGO ANALYSIS TOOL

Specify name and sequence of the oligo you would like to analyse.

**Oligo Information**

Type: DNA

Name: primer\_left

Sequence: CCGATCAAATCACAGGTCA

Length: 19 mer MW: 5765.79 [g/mol]

Properties: OD Calc | Dilution Calc | Self-Dimer Check | PCR Check

Check if a self-dimer can be formed using this primer sequence in your PCR. Self-dimers are formed by intermolecular interactions between same sense primers, where the primer is homologous to itself.

**Analyse**

Check Self-Dimer

**Result**

Max annealing score (opt. <= 14): 10

Maximum stack size: 4

```

5'      CCGATCAAATCACAGGTCA
      ||||
3'    ACTGGACACTAAACTAGCC
    
```

**Order as**

One Primer | PCR Left Primer | Cloning Oligo | NGS Reads Oligo | Custom Oligo







# Primer-BLAST

- Jednoduché rozhraní <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>
- Lze využít pro **návrh primerů** (využívá postupy Primeru 3), ale též pro **kontrolu špatného nasedání** vlastních primerů

## Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

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

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

**Vložení sekvence**

Or, upload FASTA file  Soubor nevybrán

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 70 Max 1000

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max T<sub>m</sub> difference  [Clear](#)

# Primer-BLAST: Specifita primeru

Výběr databáze  
pro kontrolu  
falešného  
nasedání

Specifikace  
organismu

**Exon/intron selection**

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

Exon junction span: No preference

Exon junction match: Exon at 5' side: 7, Exon at 3' side: 4  
Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion:  Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min: 1000, Max: 1000000

**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: Homo sapiens  
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](#)

# Primer-BLAST: Specifita primeru

Primer-BLAST >> JOB ID:WICFVGzxYVIGZ2RiaQJAUBMZUWI-Ckp\_Pw

Primer-BLAST Results

Input PCR template none  
Specificity of primers Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)  
Other reports [Search Summary](#)

## Detailed primer reports

### Primer pair 1 **Základní charakterizace navržených (nebo vložených) primerů**

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGATCAAATCACAGGT	17	51.05	47.06	4.00	2.00
Reverse primer	CCGATTAATCTCGGAT	17	47.72	41.18	7.00	4.00

#### Products on target templates

>[XM\\_024446112.1](#) PREDICTED: Homo sapiens phosphodiesterase 4D (PDE4D), transcript variant X7, mRNA

```
product length = 2106
Forward primer 1   CCGATCAAATCACAGGT 17
Template       292 G.A.GT..... 308

Forward primer 1   CCGATCAAATCACAGGT 17
Template       2397 GAA.G..... 2381
```

**Program detekuje i nedokonalé nasednutí**

>[XM\\_024446110.1](#) PREDICTED: Homo sapiens phosphodiesterase 4D (PDE4D), transcript variant X4, mRNA

```
product length = 2106
Forward primer 1   CCGATCAAATCACAGGT 17
Template       292 G.A.GT..... 308

Forward primer 1   CCGATCAAATCACAGGT 17
Template       2397 GAA.G..... 2381
```

# SW nástroje – plusy a mínusy

- **Výhody:**

- Usnadnění návrhu primerů
- Často minimální nároky na znalost uživatele
- U některých propojení s komerční firmou – možnost objednat syntézu

- **Nevýhody:**

- Pro některé cíle automatický design selhává
- Použití bez znalostí parametrů může vést k chybám

# Závěrem

- Hledání restrikčních míst i design primerů je možný **manuálně**, ale **SW nástroje** práci významně usnadňují
- **Využití** těchto postupů je velmi široké a nové aplikace se objevují každý rok
- Pochopení **principů** těchto technik je vysoce žádoucí pro každého pracovníka v oblasti biochemie a molekulární biologie

