Restrikční analýza – 5. výukový týden

1. Zakreslete do referenční sekvence úseků intronu 10 (i10) a exonu 14 (E14) genu DPYD sekvenční alterace:
   - **intron 10** (**i10**) c.1129-5923 C>G (pozice v genu 341167)
   - **exon 14** (**E14**) c.1905+1G>A (pozice v genu 471002)
   - **exon 14** (**E14**) c.1780A>T

2. Zakreslete do referenční sekvence rekogniční místa restrikčních endonukleáz:
   - **Intron 10 AluI** rozpoznává sekvenci (místo štěpení řetězce DNA je označeno |):
     5′...**A G|C T**...3′
     3′...**T C|G A**...5′
   - **Exon 14 HpyCH4IV** rozpoznává sekvenci (místo štěpení řetězce DNA je označeno |):
     5′...**A|C G T**...3′
     3′...**T G C|A**...5′
   - **Exon 14 BamHI** rozpoznává sekvenci (místo štěpení řetězce DNA je označeno |):
     5′...**G|G A T C C**...3′
     3′...**C C T A G|G**...5′

```
LOCUS       NC_000001            843317 bp    DNA     linear   CON 06-JUN-2016
DEFINITION  Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p7 Primary Assembly.
ACCESSION   NC_000001 REGION: complement(97077743..97921059) GPC_000001293
VERSION     NC_000001.11
DBLINK      BioProject: PRJNA168
            Assembly: GCF_000001405.33
KEYWORDS    RefSeq.
SOURCE      Homo sapiens (human)

341041 aatcatcgcattacataaagttaatcattaaaatgatgatcattattgcaagtttatagc i10

341101 atgctatttttatttcactcagcatcagccacatatctttcctgaatatggaggtgaaaa

341161 tcaaagctgagaatttttttaactttcccactactgtgtaaaaagaaagtgacaacctg

341221 atttgtcaaatgtaaaaaatggacccttatagctgcttactactttattggtggagacta

341281 ggaaaagagaggttggcatgtttgcttgataaaccagttgtccctcataaagacatgctc



   581                 D  I  V  T  N  V  S  P  R  I  I  R  G  T  T  E14
470821 tttactctttcatcagGACATTGTGACAAATGTTTCCCCCAGAATCATCCGGGGAACCAC

   596  S  G  P  M  Y  G  P  G  Q  S  S  F  L  N  I  E  L  I  S  E
470881 CTCTGGCCCCATGTATGGCCCTGGACAAAGCTCCTTTCTGAATATTGAGCTCATCAGTGA

   616  K  T  A  A  Y  W  C  Q  S  V  T  E  L  K  A  D  F  P  D  N
470941 GAAAACGGCTGCATATTGGTGTCAAAGTGTCACTGAACTAAAGGCTGACTTTCCAGACAA

   636
471001 Cgtaagtgtgatttaacatctaaaacaagagaattggcataagttggtgaatgtttattt
```

3. Vypočtěte délky produktů štěpení PCR amplifikátů v případě, že se bude jednat o sekvence **homozygotních nosičů wt sekvence** a **homozygotních nosičů mutantních variant** (c.1129-5923C>G; c.1905+1G>A; resp. c.1780A>T).

   Délka produktů restrikce i10 pomocí AluI:

   wt sekvence:……..

   homozygotní c.1129-5923C>G:.....…….

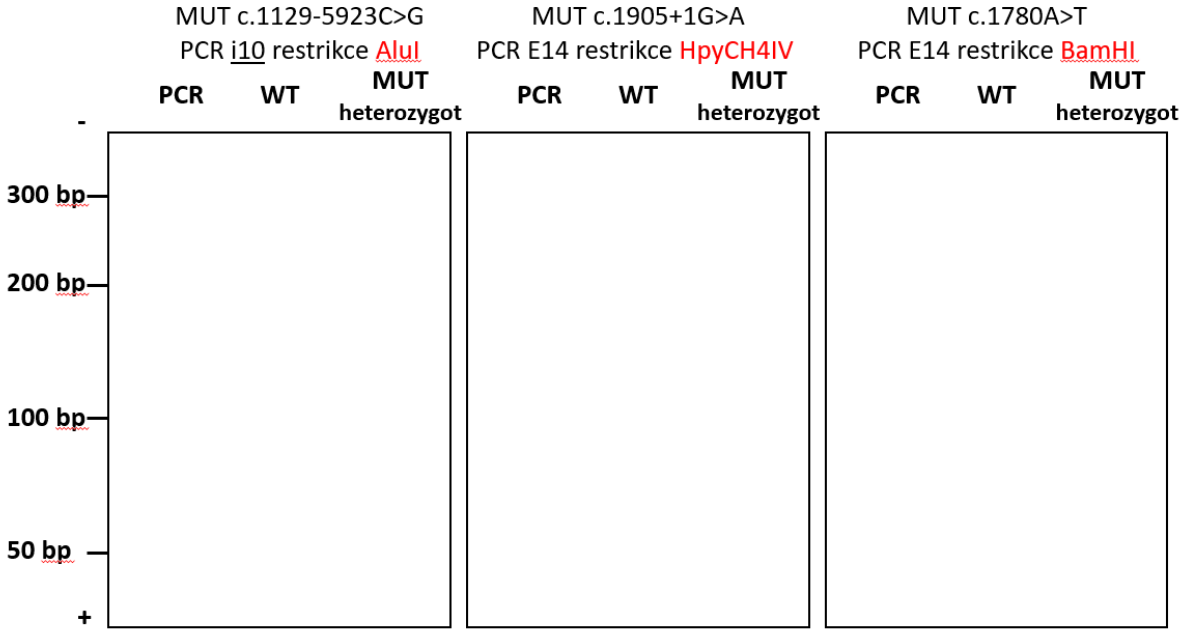
   Délka produktů restrikce E14 pomocí HpyCH4IV:

   wt sekvence:……..

   homozygotní c.1905+1G>A:……

   Délka produktů restrikce E14 pomocí BamHI:

   wt sekvence:……..

   homozygotní c.1780A>T:……

4. Očekávané fragmenty PCR po restrikčním štěpení a bez restrikce (RE) **zakreslete do schématu** elektroforézy a označte délkou (v bp):