

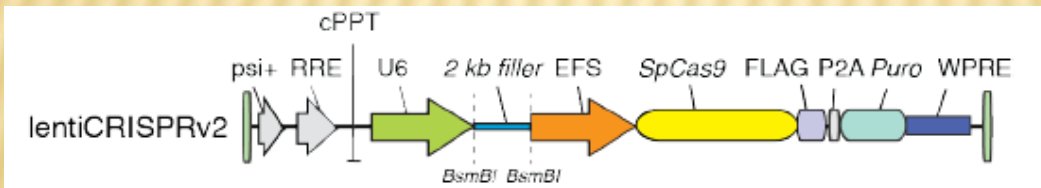
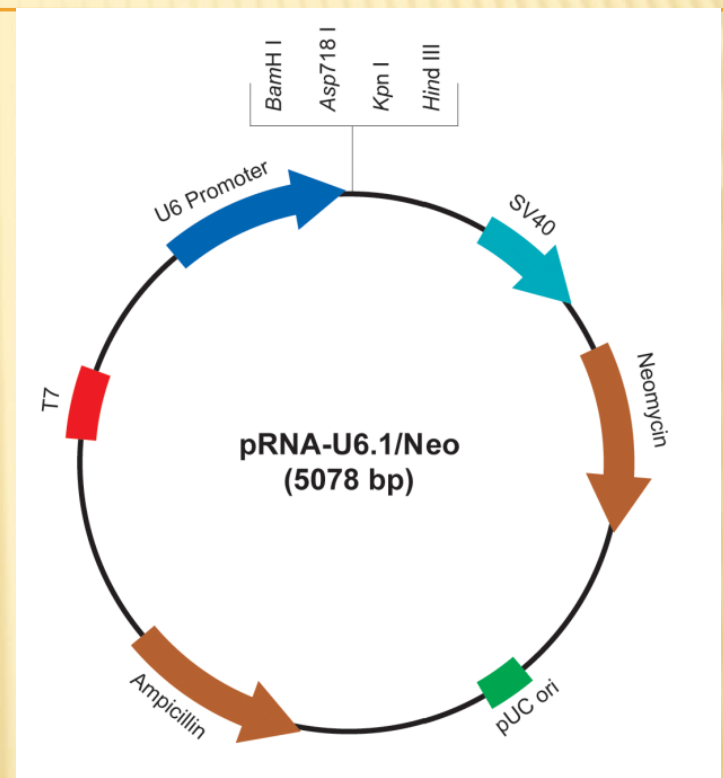
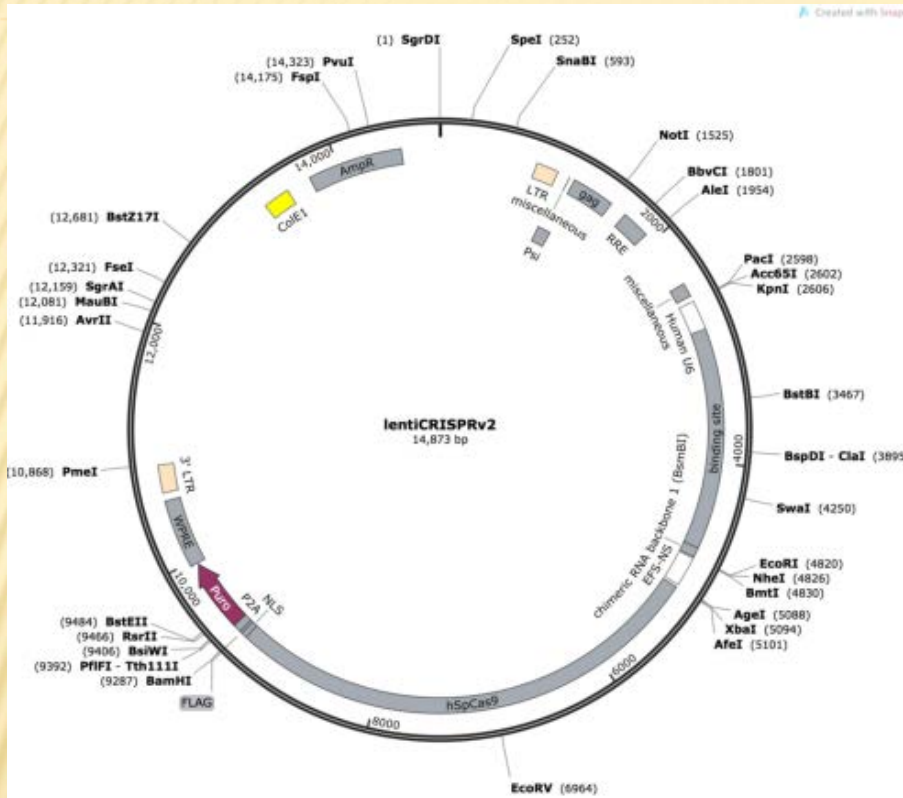
10 siRNA Sequences (Up to 10 top scoring siRNA sequences are reported, sorted by the Start position and ranked as ★★★★★ to ★★★★★☆ to indicate knockdown probability). Select the sequence to order and click "Continue".

Select	No.	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Tuschl's pattern match*	Rank ¹
<input type="checkbox"/>	1	639	GCCCATAAAGTCCTGGGTA	ORF	52.64		★★★★★
<input type="checkbox"/>	2	640	CCCATAAAGTCCTGGGTAA	ORF	47.37		★★★★☆
<input type="checkbox"/>	3	694	GGACGGACAATGCTGTGAA	ORF	52.64	B	★★★★★
<input type="checkbox"/>	4	698	GGACAATGCTGTGAAGAAT	ORF	42.11		★★★★☆
<input type="checkbox"/>	5	1159	GGTGCACCTGAGTAAATT	ORF	47.37		★★★★☆
<input type="checkbox"/>	6	1166	CCTGAGTAAATTTGACCTT	ORF	36.85	BD	★★★★★
<input type="checkbox"/>	7	1318	GCCTTGATGGCCACACTAT	ORF	52.64		★★★★☆
<input type="checkbox"/>	8	1319	CCTTGATGGCCACACTATT	ORF	47.37		★★★★★
<input type="checkbox"/>	9	1430	GCTCAAGCGACAGAAGAAA	ORF	47.37		★★★★★
<input type="checkbox"/>	10	1495	CCTCCTGGACTCTTGTA	ORF	47.37		★★★★★

Navržená shRNA:

5'-GATCCG **GCCCATAAAGTCCTGGGT**ATTCAAGAGAT**ACCCAGGACTTTATGGG**CTTTTTTGGAAA-3'

5'-AGCTTTTCCAAAAAA**GCCCATAAAGTCCTGGGT**ATCTCTTGAAT**ACCCAGGACTTTATGGG**CCG-3'



shRNA i gRNA

Spojení oligonukleotidů

Štěpení vektorů

Eluce fragmentů DNA z agarozového gelu

Ligace

Příprava kompetentních buněk E. coli

Transformace E. coli ligační směsí

Expanze klonů E. coli

Izolace plazmidové DNA

Ověření začlenění oligonukleotidu do vektoru (PCR, **sekvenace**)

Transfekce eukaryotických buněk

shRNA

SDS elektroforéza proteinů a imunobloting

gRNA

Selekce rezistentních buněk

Klonování rezistentních buněk metodou limitního ředění a expanze klonů

SDS elektroforéza proteinů a imunobloting

Izolace genomové DNA

PCR a klonování do sekvenačního vektoru

Sekvenace + analýza významu mutací

Klonování pro sekvenaci

Genomova DNA

cacctctcctctcttagaggcttcttctcccctcctcctcctcctctctcttctcttctcttctcccccccccttccc
ctccttctccccctccccctccccctctccctgggtcttctcctccaaccagggtgactccaaccaccacc
tctagtcctccagtaattgggtccagccaattttatttaaccaataattgtaaatcaaggaacaaggtttgac
a caaaaagctggtaaaactgggagaagttagcat tataat agcagt agacctaacctcgacca acccctgtcagtct
gaaaaaccaaaaagaaaagacaccaatcaaataaaaacaaaataagaaagcaccaggaaccggatctcacatggc
tgcttaaggtgcttgtaccctgccccctgagctcggggctcaaccagagttcaatcttgtccagcattcttct
gttctagaaccgcacaga **ccagcaatgccagtaccggtggc** tgagggttt tgaat cccgaccttgtaagggacc
atggaccaagaggaagatcaaaaggtaagtgtctggctggcaaaggggcagcaca cacagtgggcttgcagtgag
tctgagcatcctgtaccatccaacaacttcagggacttgtgctggatgtgtgtgtgtgtgagaggccagcttgg
tagttctgctgggtcccatagtcatgctatagcataagctgacctagggtactcctcaaaccaccagccttctgagt
gccaggtgagcggctacctcgccccatggattatccagacagctgtttgttgttgggggttgtttttcgagata
gggtttctccatgtggccttggctggcctgaaactcacagaaatccacctgcctctcatattctccctcggcctc
ccaagtgcaggaaaccactatccagtgaaactaccagctttt taactggtaaccatgacctgcca ctagggca
aggataggtaatgaatgggtggcca