

## **PŘÍLOHY**

**Příloha 1.** Sekvence fúzních primerů, které byly využity k vytvoření amplikonové knihovny pokrývající všechny známé isoformy genu *Mal d 1* a rovněž gen *Aktin*. Metoda fúzní PCR pro přípravu knihovny amplikonů vyžaduje čtyři fúzní primery: dva páry forwardových a reverzních primerů na cílovou oblast, aby bylo možné obousměrné sekvenování. K tomu jsou využívány adaptéry trP1 a A-Tg01. Jeden pár fúzních primerů má tedy oblast části adaptéru A-Tg01 (označeno modře) následovanou proximálním koncem cílové sekvence a druhý má oblast adaptéru trP1 (označeno oranžově) následovanou distálním koncem cílové sekvence. Druhý fúzní pár primerů má zaměněné adaptérové sekvence Tg01 a trP1. U adaptéru A je čeveně označena tzv. klíčová sekvence používaná pro rozpoznání molekul knihovny a normalizaci signálu.

trP1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT
A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
Tg01	TGACTCGGCAGCATCTCC
A-Tg01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGACTCGGCAGCATCTCC
Act-Tg-F01	TGACTCGGCAGCATCTCCTGACAGAATGAGCAAGGAAATTACT
Act-TrP1-R01	CTCTATGGGCAGTCGGTGATTACTCAGCTTTGGCAATCCACATC
Act-TrP1-F01	CTCTATGGGCAGTCGGTGATTGACAGAATGAGCAAGGAAATTACT
Act-Tg-R01	TGACTCGGCAGCATCTCCTACTCAGCTTTGGCAATCCACATC
Md1-Tg01-F01	TGACTCGGCAGCATCTCCGGCCCCGGAACCATCAAGAAGAT
Md1-Tg01-F02	TGACTCGGCAGCATCTCCGAAGTTGGAACCATCAAACAGAT
Md1-Tg01-F03	TGACTCGGCAGCATCTCCAGAGCAGGAAGCATCAAGAAGAT
Md1-Tg01-F04	TGACTCGGCAGCATCTCCGGAGTTGGAACCATTAAGAAGAT
Md1-Tg01-F05	TGACTCGGCAGCATCTCCGGTGTTGGAACCATCAAGAAAAT
Md1-Tg01-F06	TGACTCGGCAGCATCTCCGGTGTTGGAACCATCAAGAAAGT
Md1-Tg01-F07	TGACTCGGCAGCATCTCCGGTGTTGGAACCATCAAGAAGAT
Md1-Tg01-F08	TGACTCGGCAGCATCTCCGGAGTTGGAAGTGTTCAGAAGAT
Md1-trP1-R01	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCACCAACTTGGTCTCGTA
Md1-trP1-R02	CTCTATGGGCAGTCGGTGATCCCTCAAACCTTGACATCATA
Md1-trP1-R03	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGCTTCAAACCTTAGCCTTATA
Md1-trP1-R04	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCACCAACTTAGTCTCATA
Md1-trP1-R05	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGCGGTCAATTTGGTCTCATA
Md1-trP1-R06	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCACCAACTTAATTTTCATA
Md1-trP1-R07	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCACCAATTTGGTCTCATA
Md1-trP1-F01	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGGCCCCGGAACCATCAAGAAGAT
Md1-trP1-F02	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGAAGTTGGAACCATCAAACAGAT
Md1-trP1-F03	CTCTATGGGCAGTCGGTGATAGAGCAGGAAGCATCAAGAAGAT
Md1-trP1-F04	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGGAGTTGGAACCATTAAGAAGAT
Md1-trP1-F05	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGGTGTGTTGGAACCATCAAGAAAAT
Md1-trP1-F06	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGGTGTGTTGGAACCATCAAGAAAGT
Md1-trP1-F07	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGGTGTGTTGGAACCATCAAGAAGAT
Md1-trP1-F08	CTCTATGGGCAGTCGGTGATGGAGTTGGAAGTGTTCAGAAGAT

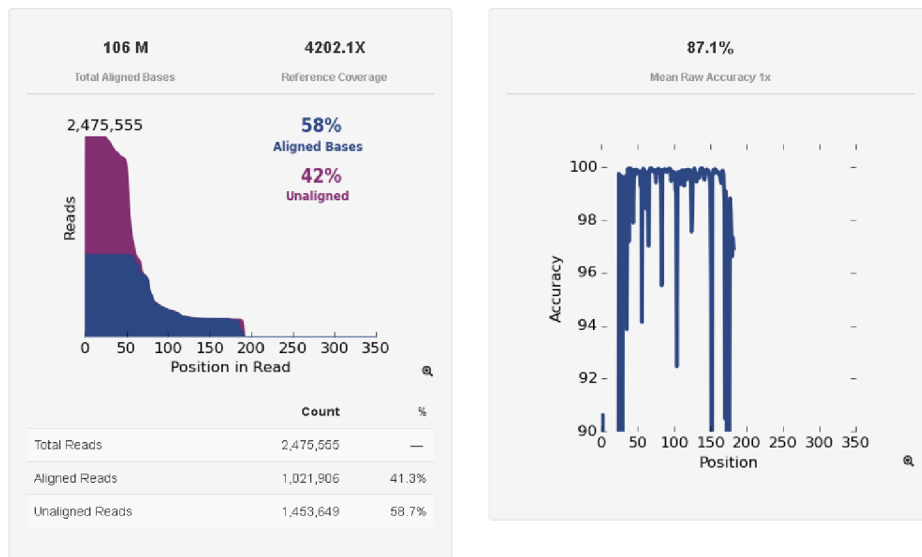
Md1-Tg01-R01	TGACTCGGCAGCATCTCCGCCACCAACTTGGTCTCGTA
Md1-Tg01-R02	CCCTCAAACCTTGACATCATATGACTCGGCAGCATCTCC
Md1-Tg01-R03	TGACTCGGCAGCATCTCCGCTTCAAACCTTAGCCTTATA
Md1-Tg01-R04	TGACTCGGCAGCATCTCCGCCACCAACTTAGTCTCATA
Md1-Tg01-R05	TGACTCGGCAGCATCTCCGCCACCAACTTAATTTTCATA
Md1-Tg01-R06	TGACTCGGCAGCATCTCCGCCACCAACTTAATTTTCATA
Md1-Tg01-R07	TGACTCGGCAGCATCTCCGCCACCAATTTGGTCTCATA

## Příloha 2. Příklad grafického výstupu softwaru Ion Reporter, kde je vyhodnocena úspěšnost vytvoření knihovny a četnost jednotlivých čtení

### Unaligned Reads

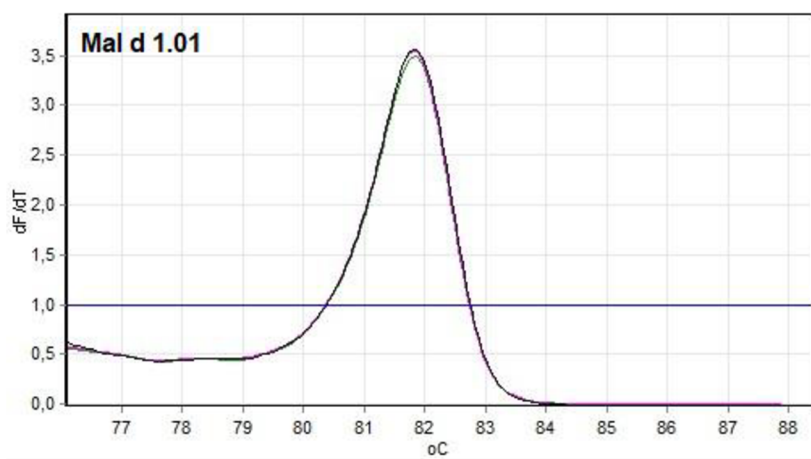


### Aligned Reads Mald1\_130606(Mald1 allergens + actin)

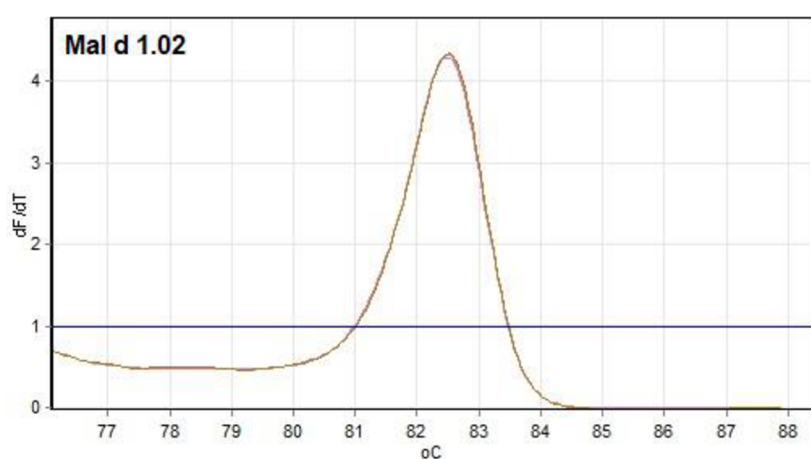


**Příloha 3.** Analýza křivek tání pro všech devět studovaných isoformů genu *Mal d 1*. Jediný pík potvrzuje specifickou PCR amplifikaci a přítomnost specifických produktů PCR.

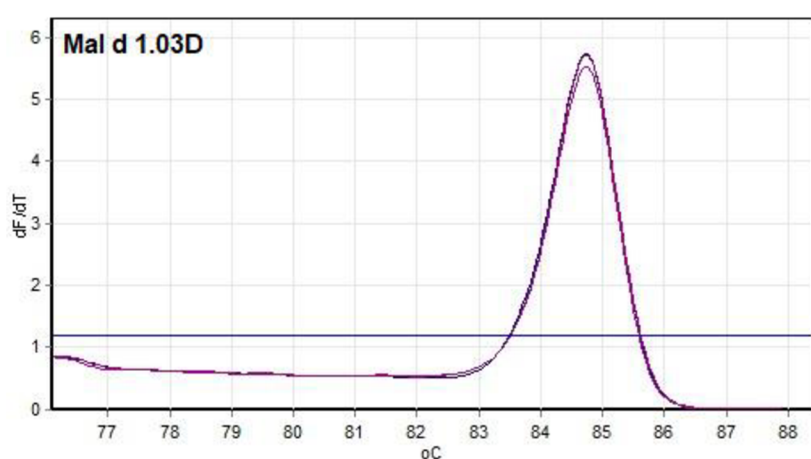
a)



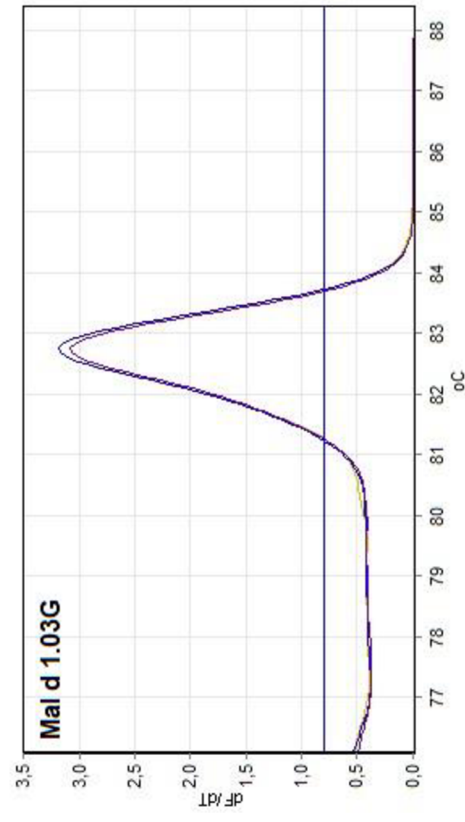
b)



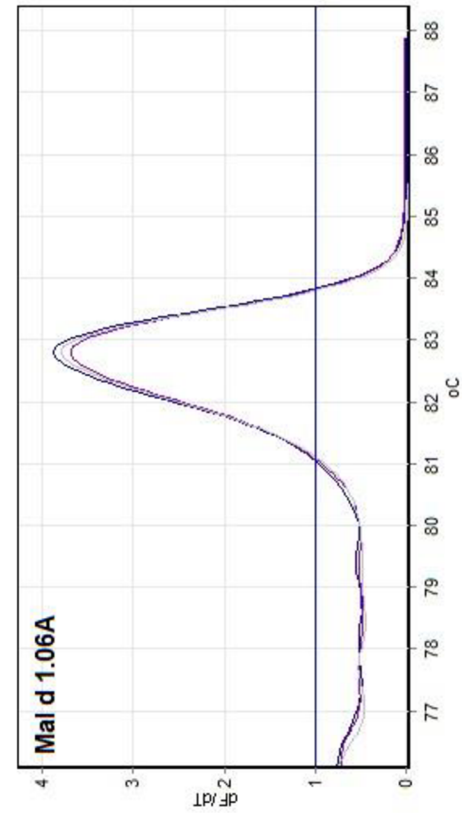
c)



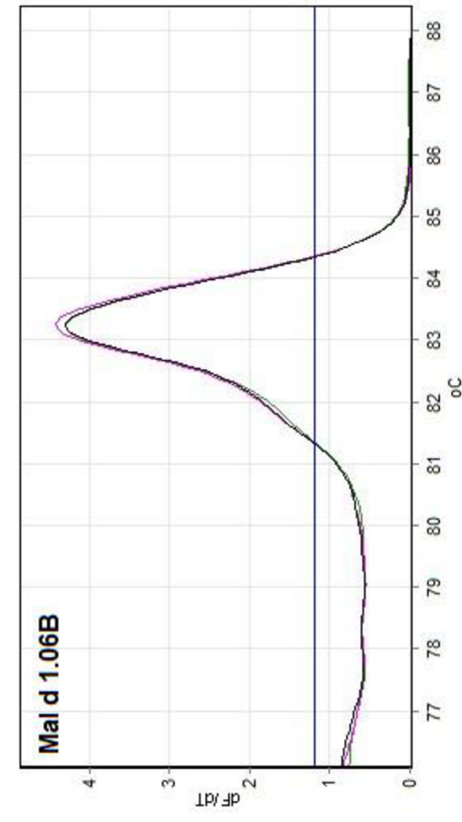
d)



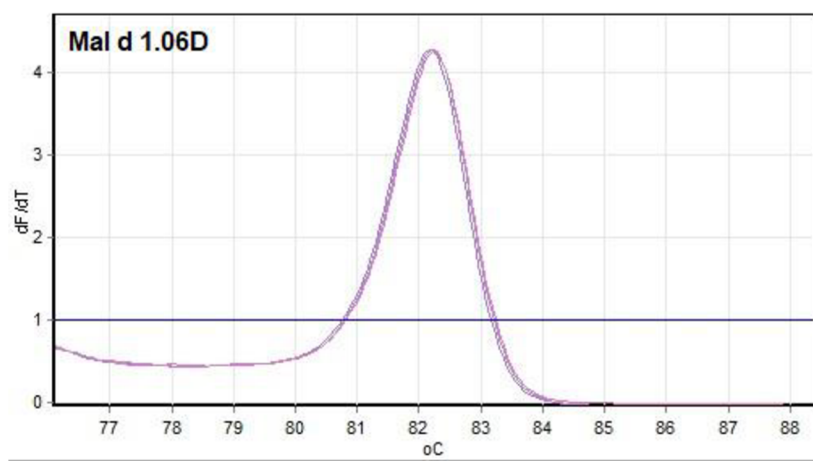
e)



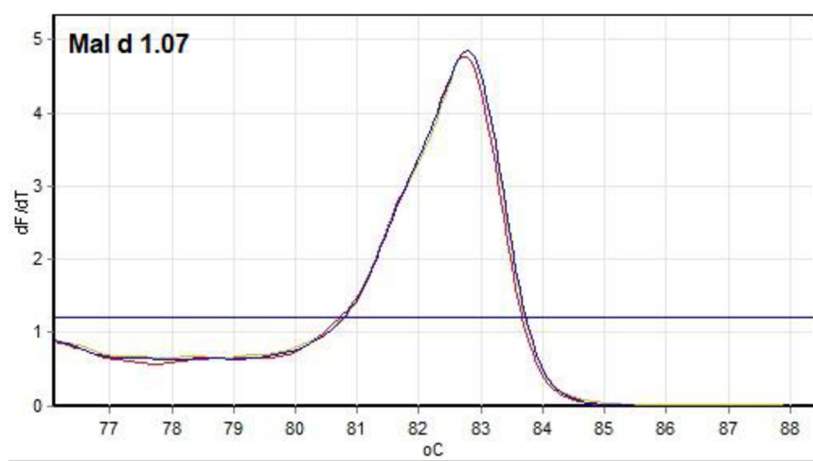
f)



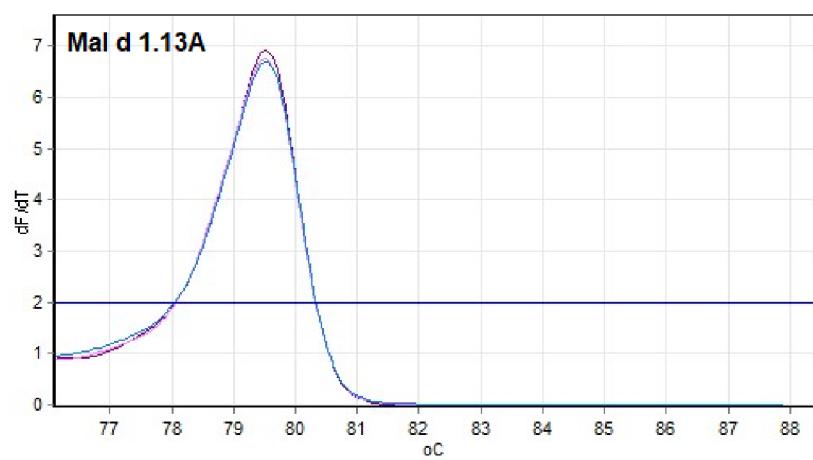
g)



h)

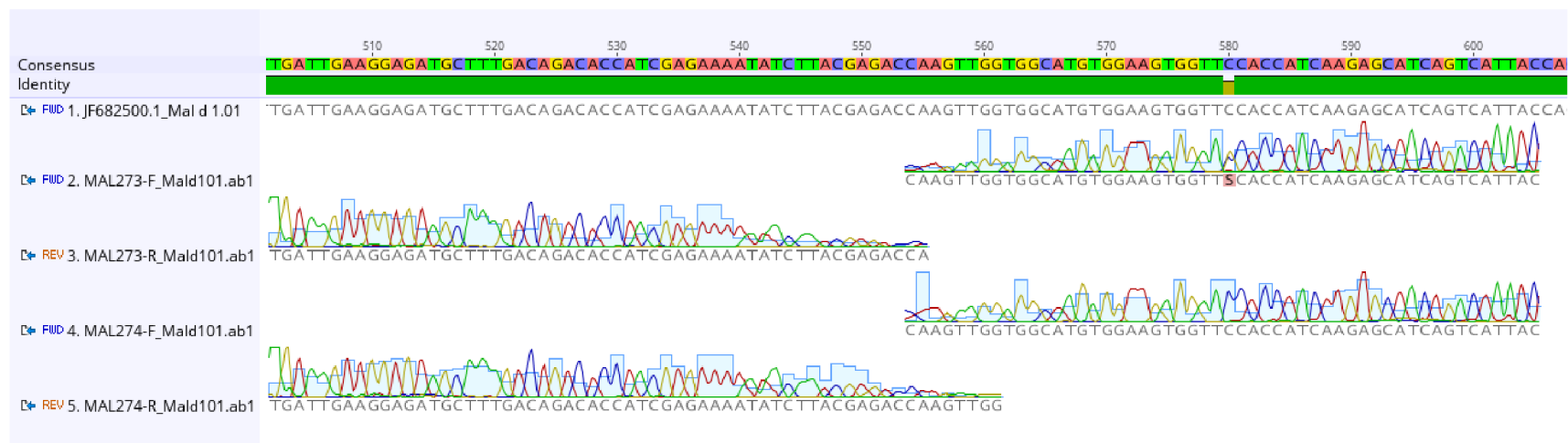


i)



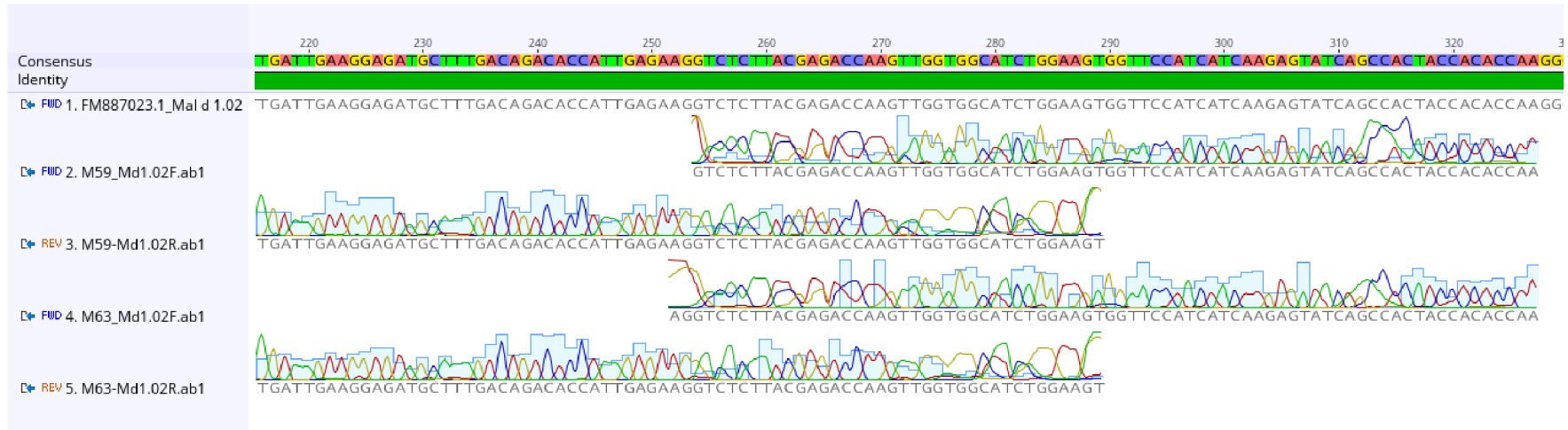
**Příloha 4.** Porovnání sekvencí jednotlivých isoformů genu Mal d 1 získaných osekvenováním ampliconů real-time PCR reakce (pro sekvenování byl použit F i R primer) se sekvencemi v databázi GeneBank (vždy první v řadě na přiloženém obrázku i s označením čísla sekvence).

a) Mal d 1.01

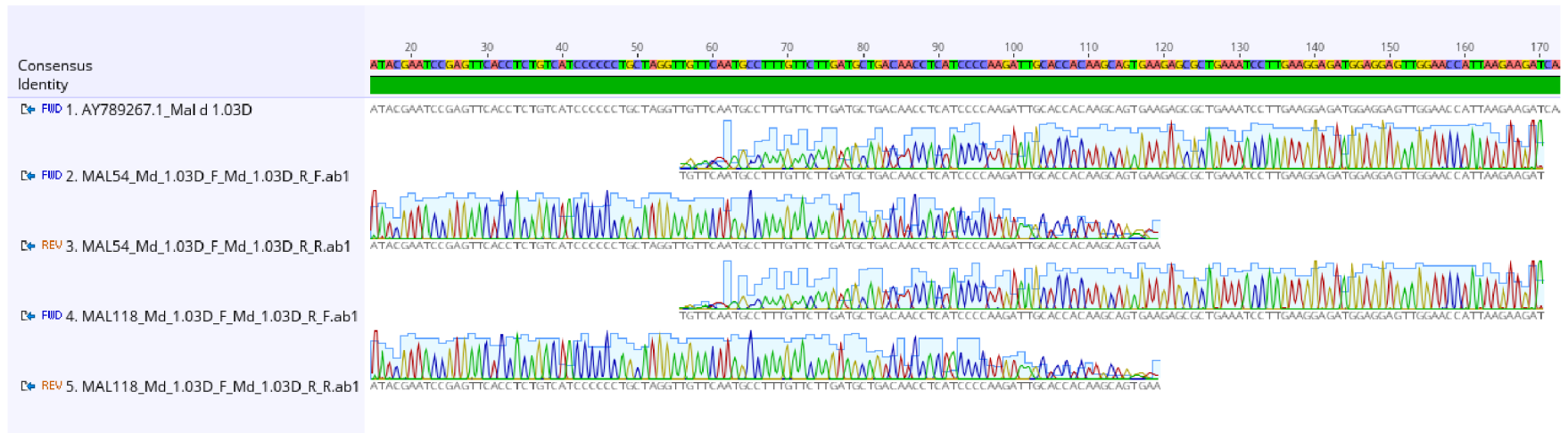




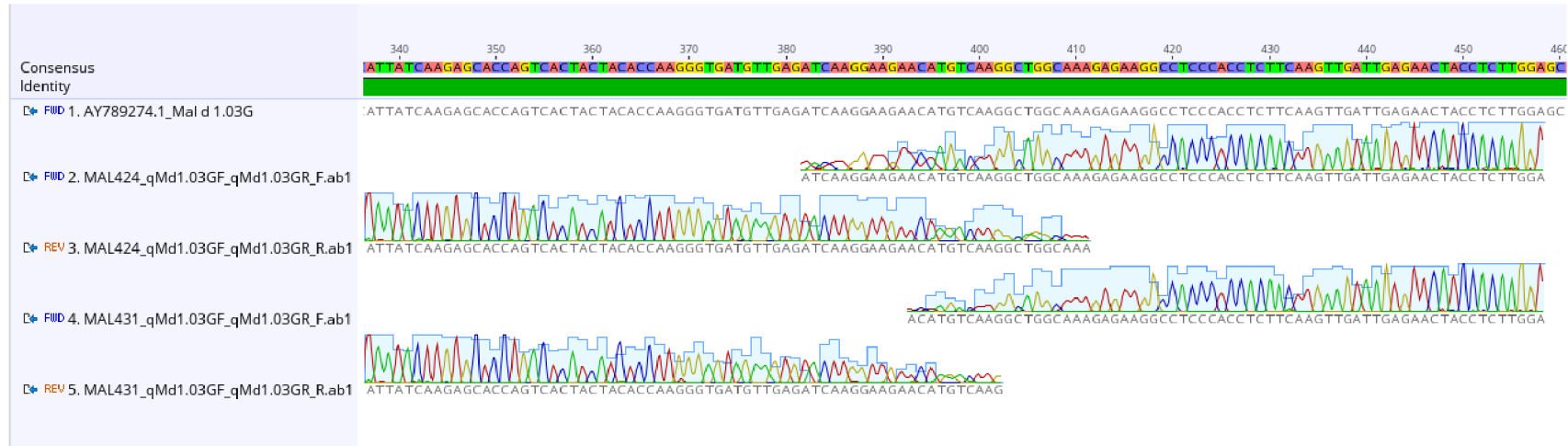
b) Mal d 1.02



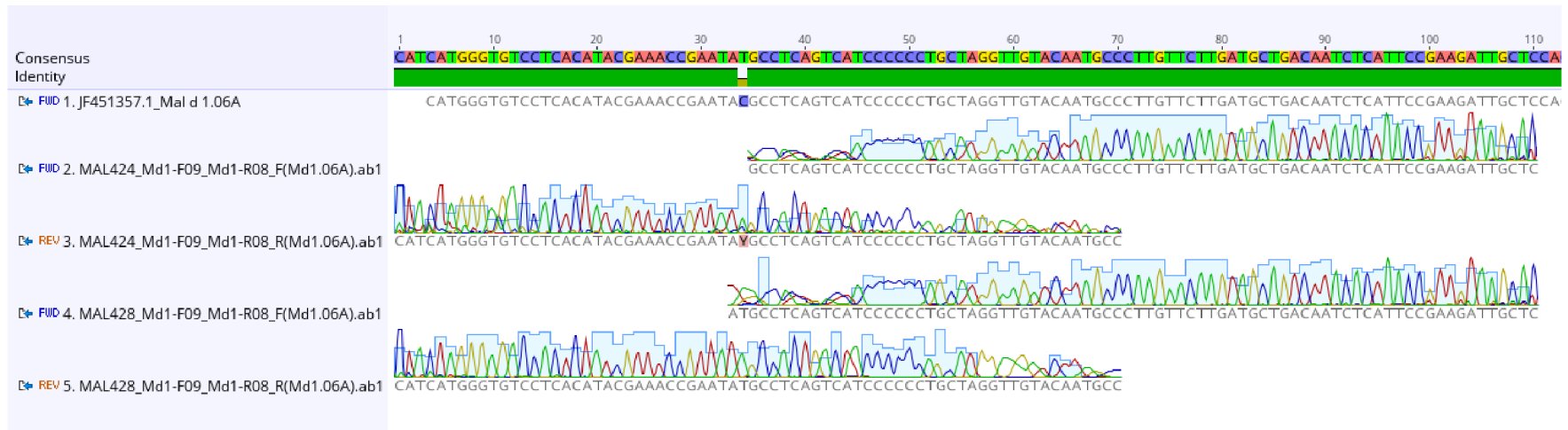
c) Mal d 1.03D



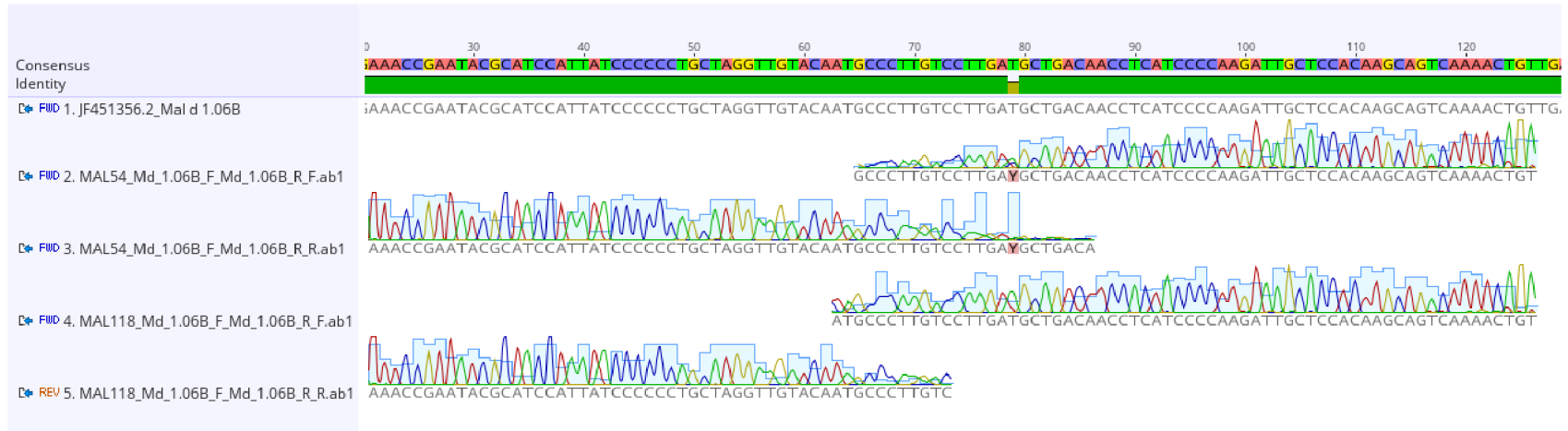
### d) Mal d 1.03G



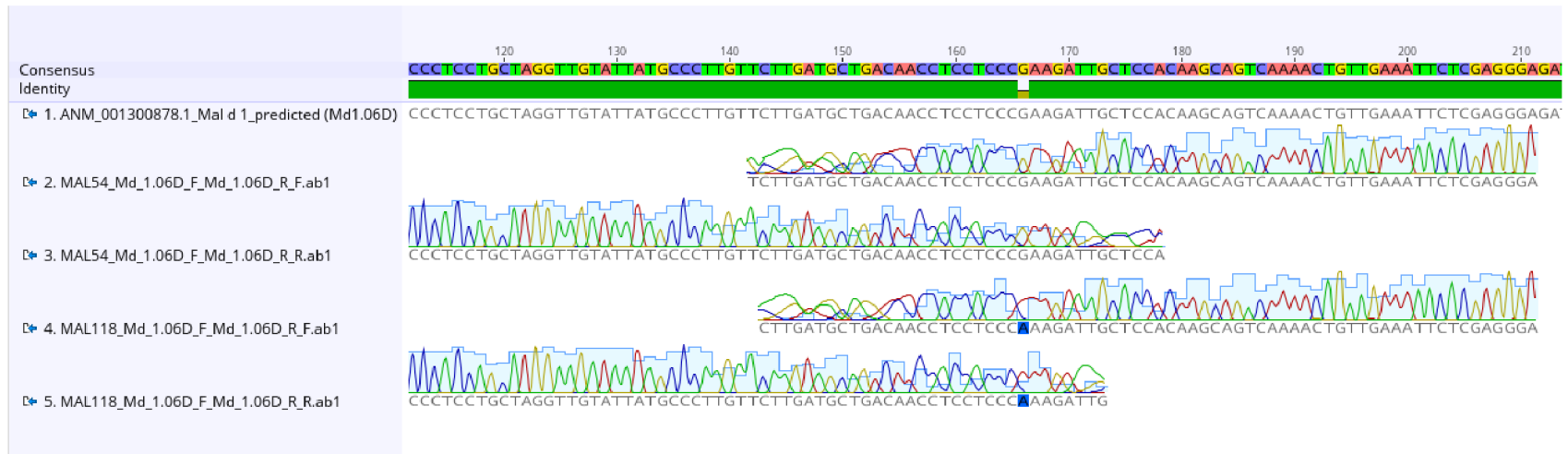
### e) Mal d 1.06A



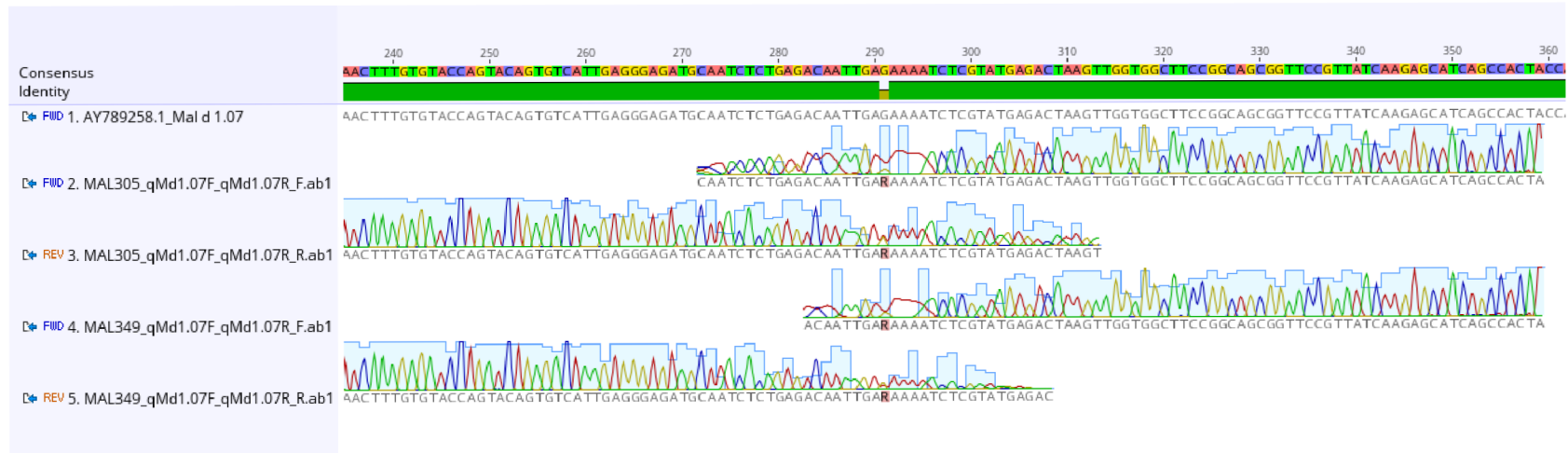
f) Mal d 1.06B



g) Mal d 1.06D



### h) Mal d 1.07



### i) Mal d 1.13A

