

Eesti koolinoorte 52. bioloogiaolümpiaad

Lõppvooru bioinformaatika praktikum



Eesnimi:

Perekonnanimi:

Kool:

Klass:

Õpetaja:

Ülesanne: Teha päriliku rinnavähi riski geenitest

Peamisi rinnavähi riskifaktoreid on mutatsioonid geenides BRCA1 ja BRCA2. On teada 3 mutatsiooni, mille olemasolu tõstab europiidsetel naistel tõenäosuse saada elu jooksul rinnavähk 80%-ni. Need mutatsioonid on:

1. BRCA1 geenis 187delAG (2-aluseline deletsioon, positsioonid 187 ja 188 kadunud);
2. BRCA1 geenis 5385insC (1-aluseline insertioon, positsioonil 5385 on lisandunud C);
3. BRCA2 geenis 6174delT (1-aluseline deletsioon, positsioon 6174 kadunud).

Sinu ülesanne on uurida neid kolme mutatsiooni ja teha ühe kohta geenitest. Millist meetodit Sa selleks kasutad, on Su enda otsustada, kuid selleks tuleb uurida geenide täpset järjestust. Juhend lõpupoole alates lk 4.

Geenide asukohad (Location) (max 4 punkti)

Geen	Kromosoom	Algus	Lõpp	Ahel (+/- ahel)	Punktid
BRCA1					/2
BRCA2					/2

Mutatsioonide uurimine (max 17 punkti)

Mutatsioon	BRCA1:187delAG	BRCA1:5385insC	BRCA2:6174delT	Punktid
Mõju lugemisraamile				/1,5
Mitmes koodon pärast mutatsiooni on stopp				/3
Mitu aminohappe jääki sünteesitakse?				/3
Mitu peaks olema?				/2
Mitmes ekson				/1,5
Eksoni asukoht (chr:start-end)				/1,5
Kas mutatsioon asub kodusjärjestuses?				/1,5
Ühe nukleotiidiliste polümorfismide (SNP) arv ± 20 bp piirkonnas				/3

Vali üks kolmest mutatsioonist, millele teha geenitest (tõmba ring ümber):

BRCA1:187delAG	BRCA1:5385insC	BRCA2:6174delT
-----------------------	-----------------------	-----------------------

Vali meetod, mida kasutad testi tegemiseks? Märki ringiga meetodi nime ümber

Meetod	Vajalikud sammud
Sangeri sekveneerimine	<ol style="list-style-type: none"> 1. Looa praimerid uuritava koha amplifitseerimiseks. 2. Looa sekveneerimise praimer.
Alleelspetsiifiline PCR	<ol style="list-style-type: none"> 1. Looa praimerid nii, et üks pool kinnitub matriitsile vaid teatud alleeli korral, teine teise alleeli korral. Paariline neil praimeritel peab sama olema.
APEX (kinnitatud praimerit pikendamine)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Looa praimerid uuritava koha amplifitseerimiseks. 2. Looa kinnitatavad uurivad praimerid (viimane 20 aluse pikkune lõik), mida pikendatakse 1 ddNTP-ga.
Tavaline PCR	<ol style="list-style-type: none"> 1. Looa praimerid uuritava koha amplifitseerimiseks. (Erinevad alleelid on erineva massiga ja liiguvad geelis eri kiirustega.)
Muu: (kirjuta nimi)	(Kirjuta ise katseks vajalikud sammud)
(skeem, pastakaga)	

Kirjuta oma disainitud praimerid 5'→3' suunal: (max 12 punkti) (Kõiki ridu ei pea ära kasutama)

Praimeripaari otstarve	Vasak (järjestus)	Parem (järjestus)	Punktid

Testi tulemuste interpreteerimine: (max 3 punkti)

Mutatsioon on, kui
Mutatsiooni ei ole, kui
Katse ebaõnnestus, kui

Kommentaar: Kirjuta lühidalt, kuidas Sinu test töötab. Vajadusel viita positiivsele ja negatiivsele kontrollile. Vajadusel joonis. **(max 2 punkti)**

--

Juhend:

Järjestuse hankimine

1. Mine aadressile: www.ensembl.org
2. Vali otsingus inimene (Human) ning kirjuta otsitava geeni nimi. Näiteks: BRCA1
3. Vajuta Go või klahvi Enter
4. Vali „By Feature type“ tabelist geenid (Gene) ja vali inimene (Human)
5. Vajuta nimekirjast selle geeni nime peale, mille nimi langeb kõige rohkem kokku sinu otsitud geeniga. (Kui leiad juba vajalikku informatsiooni, kirjuta üles)
6. Sulle näidatakse nimekirja kõikide seni leitud selle geeni isovormide kohta. Vali BRCA1 korral BRCA1-001 või BRCA2 korral BRCA2-201. Vajuta transkripti ID-le.
7. Vasakult „Transcript-based displays“ menüüst vali Sequence>cDNA või Sequence>Exons
 - a) cDNA – põhimõtteliselt vastava isovormi mRNA-st saadud järjestus. Alal „cDNA sequence“ (natuke allapoole kerida) on ära toodud esimesel real cDNA järjestus, teisel real transleeritav ala alustades startkoodonist (ATG) lõpetades stopkoodoniga (TAA, TAG, TGA) ning kolmandal real aminohappe järjestus (ühetäheline ah. tähis on keskmise nukleotiidi koha peal). Rea alguses on rea esimese sümboli järjekorra number. Selle järgi on võimalik leida konkreetsete nukleotiidide asukohti. (Soovitan avada Notepad ning märkmeid teha.)
 - b) Exons – näitab genoomsel DNA-l asuva geeni kodeerivaid (eksonid) ja mittekodeerivaid alasid (intronid). Tabelist on võimalik näha eksoni numbrit (No.), kas tegu on eksoni või introniga (Exon / Intron), vastava järjestuse algust (Start) ja lõppu (End), vastava lõigu pikkust (Length), ning järjestust ennast (Sequence), kus intronid ei ole küll päris välja kirjutatud. (Soovitan avada Notepad ning sinna mõningaid märkmeid teha.)
8. Järjestuste kätte saamiseks on võimalik kasutada vasakul menüüs alt 4. nuppu „Export data“, mille vajutamisel küsitakse:
 - a) Väljundi (output) formaatil. Meile sobib FASTA (see on kõige tavalisem tekstiversioon).
 - b) Ahel (strand): kas uuritav (featured), + ahel (forward) või – ahel (reverse).
 - c) On võimalik öelda, mitu nukleotiidi üle 5' või 3' otsa tahame järjestusele lisada (5' Flanking sequence, 3' Flanking sequence).
 - d) Küsitakse, kuidas esitatakse genoomne järjestus?
 - (a) Unmasked – maskeerimata, täiesti tavaline järjestus
 - (b) Repeat Masked (soft/hard) – kordusjärjestused maskeeritakse „soft“ korral väiketähtedega, „hard“ korral N-dega.
 - (c) 5', 3' Flanking sequence – väljastatakse vastavad üleulatuvad ala järjestus.
 - (d) None – ei tehta midagi.
 - e) Millisid järjestusi tahetakse?
 - (a) Select/deselect all – võimaldab kõik või mittemidagi valida
 - (b) cDNA – mRNA-le vastav DNA lõik
 - (c) Coding sequence – kodeeriv ala
 - (d) Peptide sequence – aminohapete järjestus
 - (e) 5' UTR – enne esimest eksoni olev ala
 - (f) 3' UTR – pärast viimast eksoni olev ala
 - (g) Exons – DNA lõigud, mis kajastuvad mRNA-s
 - (h) Introns – DNA lõigud, mis vastavad neile RNA lõikudele, mis lõigatakse mRNA-st pärast transkriptsiooni välja.
9. Ärge 8. punktis valimisega liiga ahneks minge ning säilitage saadud (üks) järjestus edasiseks tööks. (Notepad näiteks.)

Praimerite disain

1. Mine aadressile <http://bioinfo.ut.ee/snpmasker/>.
2. Genoomi versioon (Please select genome and dbSNP version) jäta Homo sapiens peale.
3. Oma järjestuse sisestamiseks on 3 varianti (vali ainult 1):
 - a) sisesta piirkonna aadress: kromosoom (Chromosome), algus (start position) ja lõpp (end position);
 - b) kopeeri oma järjestus seal olevasse suurde kasti või;
 - c) järjestust sisaldav .txt fail (valimiseks vajuta browse).
4. SNP maskeeritakse: (soovitan a või b, ülejäänul hetkel vahet pole)
 - a) N-idega;
 - b) väiketähtedega;
 - c) IUPAC-i koodidega (lähemalt <http://www.bioinformatics.org/sms2/iupac.html>);
 - d) enda valitud sümboliga.
5. Ülejäänud sätted jätta samaks. (Repeat-masker teeb kordusjärjestused tumedateks väiketähtedeks.)
6. Viimasesse kasti on võimalik sisestada oma e-mail, kuhu saadetakse teade töö valmimisest (pole kohustuslik).
7. Vajuta „Run SNPmasker“ ja oota ~10 sekundit. Kui viga tuleb, kontrolli kas sisestasid + ahela või kas koordinaadid on õiget pidi.
8. Vajuta „Check result“, et tulemust näha. Lühemad järjestused kui 10 000 alust kuvatakse ekraanil, teisi on võimalik näha vaid txt kujul. (Tee vajalikke märkmeid)
9. Nüüd mine aadressile <http://bioinfo.ut.ee/mprimer3/>.
10. Kopeeri oma järjestus esimesse suurde kasti. Kui sa oled eelnevalt lasknud midagi N-idega maskeerida, siis nendele aladele ei pakuta praimereid. Vastasel juhul võib praimer sattuda SNP peale (enamasti on see ebasoovitatav, aga mõnikord on see taotluslik – näiteks alleelspetsiifiline PCR).
11. Vajuta esimese „Pick Primers“ nupu peale, et tutvuda väljundiga. Oota hetk!
12. Esimesena näidatakse kõige paremat varianti antud tingimustel (left primer – vasak praimer, right primer – parem praimer), lõpupoole on veel mõned head variandid. Olulised punktid:
 - a) start – näitab millisel positsioonil praimer pihta hakkab. (Kas sinu uuritav piirkond jääb parema ja vasaku praimeri vahele?) **NB!** Käesolevas järjestuses pruugi mutatsiooni asukoha number vastata mutatsioon nimes oleva arvuga, eriti kui oled lisanud 5' ja 3' alasid.
 - b) len – praimeri pikkus.
 - c) tm – temperatuur, mil pool praimeritest on denatureerunud ning pool on veel seondunud matriitsiga (soovitatav hoida parema ja vasaku praimeri Tm-id sarnased).
 - d) seq – praimeri järjestus ise.
 - e) product size – PCR-st saadava produkti suurus.

- f) Allpool on toodud järjestus ning näidatud praimeride seondumine märkidega >>> ja <<< vastavalt vasaku ja parema praimeride 5'→3' suunaga.
13. Kui praimer sobib tehtava geenitestile, siis jätk punktist 20, kui ei, jätk 14.
14. Vajuta „Back“ ning vaata punkte 15...18. Kõiki ei pea korraga katsetama.
15. Eelnevalt vajutatud nupu all on variandid
- Targets – sihtmärgid. Võid valida kas:
 - Kirjuta arv, mitmendast positsioonist olev nukleotiid peab jääma PCR produkti sisse, komaga lisada mitu järjestikust nukleotiidi peab olema. Näiteks 4260,20 viitab, et kindlasti on sees positsioonid 4260...4279.
 - Või märgi üleval lähtejärjestuses ära [] (nurksulgusega).
 - Overlap Junction List – kirjuta need positsioonid, mida praimeride disainil ignoreerida, või märgi järjestuses nende nukleotiidide ette - (miinus).
 - Excluded Regions – piirkonnad, mida sa kindlasti ei taha oma produkti sisse saada. Kirjuta positsioonid või järjestuses märgi need < > (võrratusmärksid) vahele.
 - Force Left/Right Primer Start/End – määra kindlaks kas vasaku või parema praimeride algus või lõpp. Kirjuta positiivne täisarv, kui sa tahad seda võimalust kasutada.
16. General Primer Picking Conditions – selles sektsioonis saad valida praimeride pikkust (Primer Size, max – maksimaalne, min – minimaalne, opt - optimaalne), praimeride T_m ning maksimaalset praimeride T_m-ide vahet (Max T_m Difference). Kui on soovi võib ka produkti T_m muuta, juhul kui tegelete väga väikeste produkti suurustega (Product T_m) ning praimeride GC sisaldust (Primer GC%)
17. Võimalik on valida ka saadava produkti suurust (Product Size Ranges). Vahemiku algus ja lõpp eraldada miinusega. Näiteks 250-600. (Hoida alla 1000)
18. Võimalus on veel proovida suurendada maskeeritud SNP-de lubamist praimeridesse (Max #N's accepted) ning pikkade ühenukleotiidiliste korduste lubamist (Max Poly-X).
19. Pöördu punkti 11 juurde tagasi. (Pick Primers)
20. Kui sobis, märgi praimerid üles nii vastustelehele kui endale Notepadi.
21. Oma praimeride töö kontrollimiseks mine <http://bioinfo.ut.ee/genometester/>.
22. Genoom (Please select the genome) jäta Homo sapiens.
23. Võid panna oma tööle nime (ID), kuid pole kohustuslik.
24. Kopeeri oma praimerid vastavalt vasak (Left) ja parem (Right) lahtritesse ning vajuta „Run GenomeTester“. Oota mõned sekundid ja vajuta „Check results“.
25. Vali „Statistics file“ alt „HTML“ link, et näha oma praimeride seondumist.
- „# of LEFT binding sites“ näitab, mitmesse kohta vasaks praimer seondus,
 - „# of RIGHT binding sites“ näitab mitmesse kohta parem praimer seondus
 - „# of PRODUCTS“ näitab mitu produkti tekkis. „1“ on väga hea vastus!