

## Ćwiczenie 12

### Diagnostyka molekularna. Poszukiwanie SNPs Odczytywanie danych z sekwencjonowania

Prof. dr hab. Roman Zieliński

#### 1. Diagnostyka molekularna

##### 1.1. Pytania i zagadnienia

- 1.1.1. Jak definiujemy markery genetyczne?
- 1.1.2. Jakie wyróżniamy rodzaje markerów genetycznych?
- 1.1.3. Podaj cechy dobrego markera.

##### 1.2. Ćwiczenia

- 1.2.1. Na podstawie poniższej tabeli porównaj markery genetyczne.

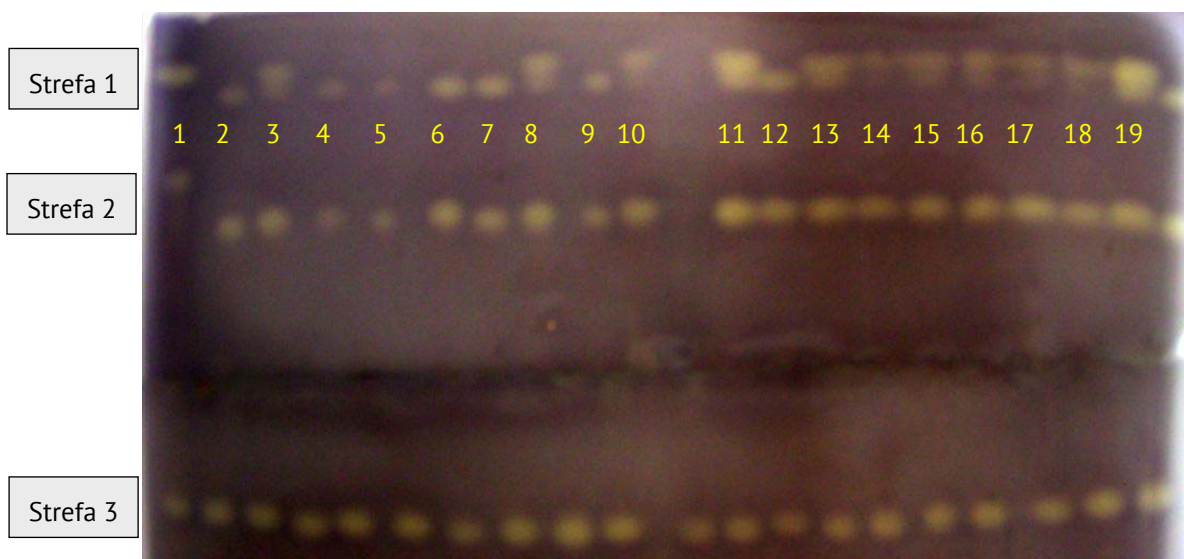
Cecha	Markery morfologiczne	Markery enzymatyczne	Markery DNA
Dziedziczenie (dominacja/kodominacja)			
Współdziałanie genów			
Poziom polimorfizmu			
Wpływ środowiska			
Wartość adaptacyjna (neutralność)			
Liczebność			
Łatwość wykrywania/generowania			
Kosztochłonność			

Ćwiczenie można wykonać w grupach i omówić.

1.2.2. Zaplanuj doświadczenie, które pozwoli opracować szybką metodę diagnostyki wybranej choroby za pomocą markerów molekularnych przy założeniu, że ma ona charakter dziedziczny.

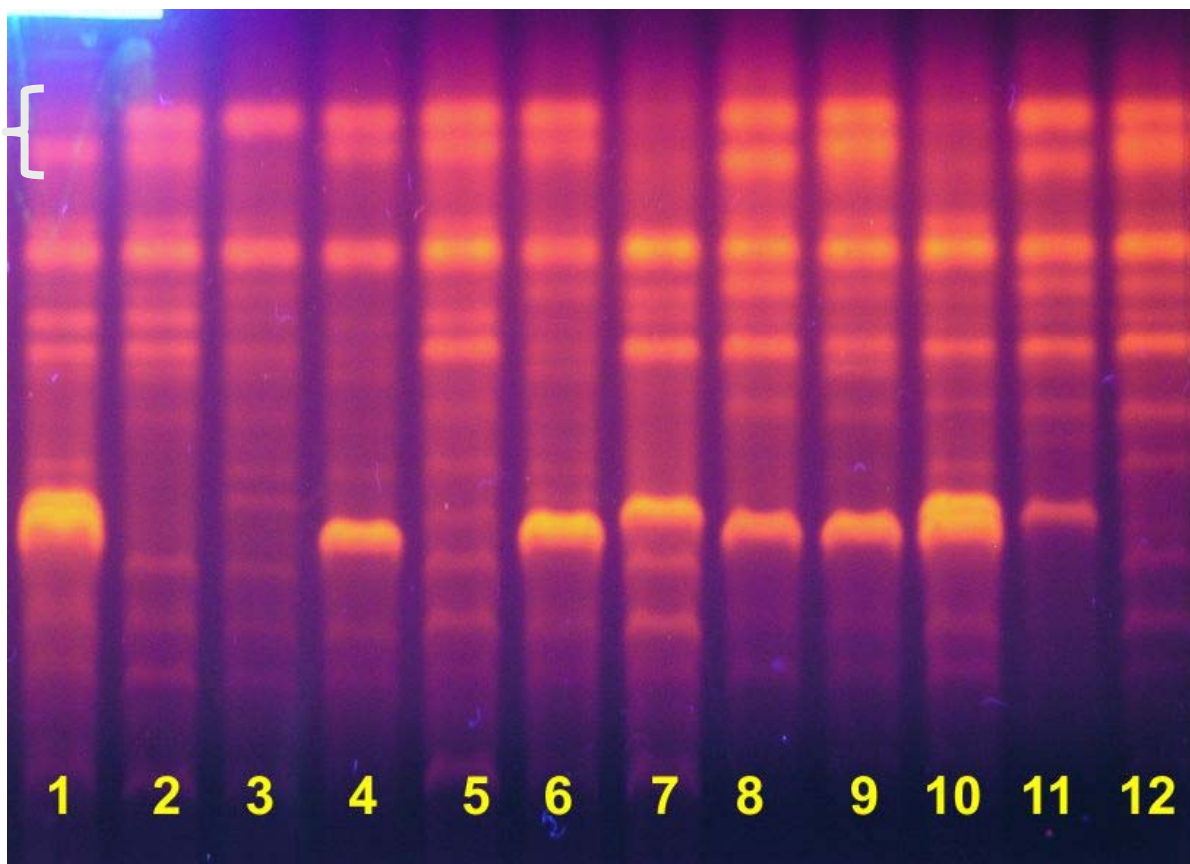
- Jaka populacja powinna być uwzględniona w badaniach?
- Jakie czynniki wpłyną na wybór metodologii?
- Jak należy zaplanować analizy, gdy geny związane z potencjalną chorobą są zidentyfikowane i znana jest ich sekwencja?
- Jak należy zaplanować doświadczenie, gdy wiemy, że choroba jest jednogenowa, ale gen nie został zidentyfikowany?
- Jak należy zaplanować doświadczenie, gdy nie są znane uwarunkowani genetyczne danej choroby?

1.2.3. Na rysunku poniżej przedstawiono rozdział elektroforetyczny izoenzymów dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Wiedząc, że aktywny enzym jest monomerym zinterpretuj uzyskany żel.



- Zidentyfikuj co oznaczają strefy 1-3.
- W której strefie obserwujemy allozymy?
- Przyjmując oznaczenia A1 i A2 dla różnych alleli w strefie 1 podaj genotypy osobników 1–19.

1.2.4. na rysunku poniżej przedstawiono wynik rozdziału elektroforetycznego markerów opartych o reakcję PCR. Markery te identyfikują sekwencje znajdujące się na stykach intronów i egzonów.



- Ile różnych loci widoczne jest na żelu? (Dla ułatwienia proszę odczytać tylko najsilniejsze prążki).
- Ile jest loci segregujących?
- Odczytaj genotypy osobników w zaznaczonej strefie? Ile loci obejmuje ta strefa? Jak należy oznaczyć segregujące allele?

### 1.3. Problemy

- 1.3.1. Pomimo powszechności technik sekwencjonowania genomów, markery genetyczne nadal są stosowane. Zastanów się kiedy stosowanie markerów genetycznych jest bardziej efektywne niż sekwencjonowanie?
- 1.3.2. Metody molekularne często obarczone są błędami. Z czego wynikają błędne odczyty w przypadku markerów izoenzymatycznych oraz markerów DNA? Jak można zapobiegać tym błędom lub je minimalizować?

## 2. Poszukiwanie SNPs

### 2.1. Pytania i zagadnienia

2.1.1. Co oznacza skrót SNP?

2.1.2. Jakiego typu zmiany wykrywa się za pomocą SNPs?

### 2.2. Ćwiczenia

#### 2.2.1. Poszukiwanie SNPs w sekwencji DNA.

- Wejdź na stronę programu CLUSTAL omega dostarczonego przez EMBL: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- W otwartym oknie (Multiple Sequence Alignment) znajduje się formularz do wprowadzenia sekwencji nukleotydowej.

#### Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#).

**Important note:** This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

DNA

sequences in any supported format:

Or, upload a file:  No file selected.

[Use a example sequence](#) | [Clear sequence](#) | [See more example inputs](#)

- Wybierz opcję DNA.
- Wprowadź sekwencje dostarczone w pliku rDNA Pinus.seq. Jest to plik tekstowy z trzema sekwencjami zapisanymi w formacie FASTA.
- Wprowadź dostarczone sekwencje poprzez ich przekopiowanie do okna (sequences in any supported format) lub przez załadowanie pliku rDNA Pinus.seq za pomocą opcji „browse” pod oknem (w tym przypadku należy plik z serwera skopiować na własny komputer).
- W punkcie 2 i 3 (Step2 i Step 3) pozostaw domyślne parametry.
- Zatwierdź analizę za pomocą „submit”.
- Po kilku sekundach powinien pojawić się ekran z uliniowaniem
- Przekopiuj uzyskane uliniowanie do pliku i zaznacz pozycje występujących SNPs.
- Czy oprócz SNPs występują także inne mutacje? Zaznacz je i podaj nazwę.

Clustal Omega

[Input form](#) | [Web services](#) | [Help & Documentation](#) | [Bioinformatics](#)

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Results for job clustalo-I20190222-224441-05

[Alignments](#) | [Result Summary](#) | [Phylogenetic Tree](#) | [Submission Data](#)

[Download Alignment File](#) | [View result with Jalview](#) | [Send to Simple](#)

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
05MUGO-RDNA.F.ab1      ---GCATGTCCTAAGTATGAACATAATTCAGACTGTGAAC
RDNA-F-01MUGO.ab1     CATGCATGTCCTAAGTATGAACATAATTCAGACTGTGAAC
RDNA-F-07MUGO.ab1     --TGCATGTCCTAAGTATGAACATAATTCAGACTGTGAAC
*****
```

**Samodzielne wykonanie ćwiczenia 2.2.1 – 3 punkty**

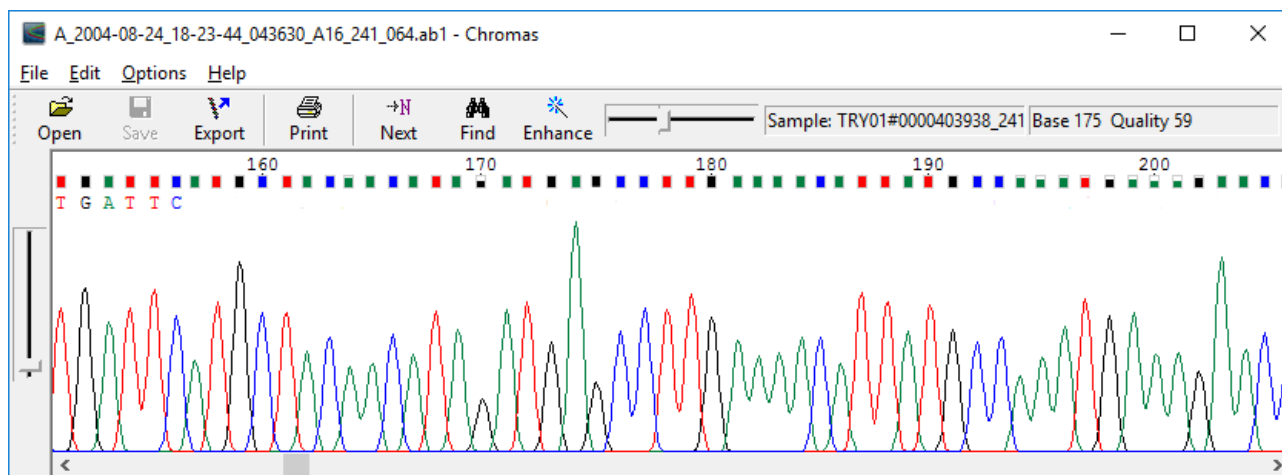
### 3. Odczytywanie sekwencji DNA

#### 3.1. Pytania i zagadnienia

- 3.1.1. Jakie znasz metody sekwencjonowania DNA?
- 3.1.2. Jak wygląda odczyt sekwencji z żelu poliakrylamidowego a jak z wydruku komputerowego będącego efektem sekwencjonowania metodą Sangera z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych?
- 3.1.3. Czy możliwe jest odczytanie sekwencji całego genomu człowieka bez pomocy komputera? Uzasadnij odpowiedź.

#### 3.2. Ćwiczenia

- 3.2.1. Odczyt sekwencji z programu CHROMAS



- Korzystając z klucza znajdującego się na początku powyższego wydruku, podaj sekwencję DNA.

***Uwaga: ze względu na różne kolory zasad pracę należy wykonać w komputerze lub kolorowym wydruku.***

#### 3.3. Problemy

- 3.3.1. Metody molekularne są obecnie często wykorzystywane w kryminalistyce. Wyobraź sobie, że jesteś adwokatem osoby oskarżonej o poważne przestępstwo na podstawie testów DNA. Osoba ta twierdzi, że w czasie przestępstwa była w innym miejscu oddalonym o 500 km od miejsca przestępstwa. Twierdzenia oskarżonej osoby potwierdziło 5 świadków. W jaki sposób możesz wykazać, że oskarżony jest niewinny?

***Zadanie można wykonać dzieląc się na dwie grupy, oskarżycieli i obrońców.***