

## Ćwiczenie 13

### Rodzaje RNA i metody analizy transkryptomu. Real Time PCR (qPCR); Analiza ekspresji genów u człowieka.

Prof. dr hab. Roman Zieliński

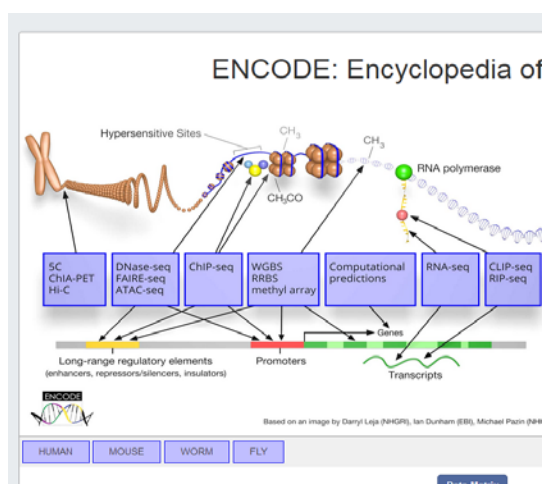
#### 1. Rodzaje RNA i metody analizy transkryptomu.

##### 1.1. Pytania i zagadnienia

- 1.1.1. Jakie są podstawowe typy RNA?
- 1.1.2. Co to jest transkryptom, cDNA?
- 1.1.3. Wymień etapy analizy transkryptomu.

##### 1.2. Ćwiczenia

- 1.2.1. Proszę wejść na stronę projektu ENCODE: <https://www.encodeproject.org/> i przeprowadzić analizę transkryptomu człowieka.



- Proszę wybrać RNA-seq
- Proszę wybrać „data matrix”.

Po wyborze „data matrix” pojawi się sumaryczna tabela ze zgromadzonymi danymi. W kolumnie po lewej stronie proszę wybrać *Homo sapiens* i odczytać następujące dane.

### Experiment matrix

Enter search terms to filter the experiments included in the matrix.

| Assay                         | Assay category                | Target of assay               | Date released                 | Available data                |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ChIP-seq 8699                 | DNA binding 8699              | transcription factor 3817     | July, 2013 2156               | fastq 13849                   |
| DNase-seq 835                 | Transcription 3132            | histone 3034                  | March, 2014 829               | bam 13014                     |
| polyA RNA-seq 770             | DNA accessibility 1100        | control 2599                  | July, 2016 608                | bigWig 11906                  |
| shRNA RNA-seq 523             | RNA binding 699               | broad histone mark 1690       | May, 2016 527                 | bed narrowPeak 7492           |
| total RNA-seq 486             | DNA methylation 569           | RNA binding protein 1450      | October, 2016 462             | bigBed 7484                   |
| <a href="#">+ See more...</a> | <a href="#">+ See more...</a> | <a href="#">+ See more...</a> | <a href="#">+ See more...</a> | <a href="#">+ See more...</a> |

#### Experiment status

- released 14659
- archived 1044
- revoked 265

#### Organism

- Homo sapiens* 10217
- Mus musculus* 1896
- Drosophila melanogaster* 1422
- Caenorhabditis elegans* 957
- Drosophila pseudoobscura* 4

[+ See more...](#)

### 14659 results

Clear Filters

| cell line      | ASSAY    |           |               |               |               |       |             |               |      |              |          |                |         |                |                  |      |                 |               |            |      |                |  |  |  |  |
|----------------|----------|-----------|---------------|---------------|---------------|-------|-------------|---------------|------|--------------|----------|----------------|---------|----------------|------------------|------|-----------------|---------------|------------|------|----------------|--|--|--|--|
|                | ChIP-seq | DNase-seq | PolyA RNA-seq | shRNA RNA-seq | total RNA-seq | eCLIP | DNase array | small RNA-seq | WGBS | microRNA-seq | ATAC-seq | RNA microarray | RAMPAGE | RNA Bind-n-Seq | genotyping array | CAGE | microRNA counts | shRNA RNA-seq | Replic-seq | RRBS | ...and 25 more |  |  |  |  |
| <b>K562</b>    | 669      | 10        | 19            | 268           | 11            | 245   | 3           | 7             | 1    | 2            | 10       | 1              | 2       | 9              | 1                | 50   | 6               | 1             |            |      |                |  |  |  |  |
| <b>HepG2</b>   | 357      | 3         | 11            | 255           | 5             | 210   | 3           | 3             | 2    |              | 6        |                |         | 2              | 6                | 1    | 6               | 2             |            |      |                |  |  |  |  |
| <b>A549</b>    | 374      | 14        | 27            |               |               | 2     | 9           | 1             |      | 5            | 2        |                |         | 2              | 3                |      | 2               | 1             |            |      |                |  |  |  |  |
| <b>GM12878</b> | 226      | 2         | 13            | 3             | 3             | 6     | 1           | 1             |      | 7            | 1        |                |         | 2              | 6                | 1    | 6               | 2             |            |      |                |  |  |  |  |
| <b>HEK293</b>  | 257      |           |               |               |               | 2     |             |               |      |              | 1        |                |         | 2              |                  |      |                 |               |            |      |                |  |  |  |  |

- A) Z ilu organów zdeponowano w bazie sekwencje RNA.
- B) Z jakich organów najczęściej pobierano RNA? Proszę podać procentowy udział pierwszych 5 wyników.
- C) Z jakiego organu najrzadziej pobierano RNA?
- D) Z ilu typów komórek zdeponowano w bazie sekwencje RNA.
- E) Z jakich komórek najczęściej pobierano RNA. Proszę podać procentowy udział pierwszych 5 wyników.
- F) Z jakich komórek najrzadziej pobierano RNA (jeden wynik)?

**Wyniki dla B i E proszę przedstawić na wykresie**

**Samodzielne wykonanie ćwiczenia 1.2: 3 pkt.**

**1.3. Problemy**

1.3.1. Korzystając z wiadomości przedstawionych na wykładzie zastanów się nad uzasadnieniem stosowania poszczególnych metod w przypadku podejrzenia:

- choroby uwarunkowanej ekspresją zmutowanego allele genu, którego sekwencja jest znana;
- choroby uwarunkowanej wieloma genami, z których większość nie jest poznana, ale wiadomo, na którym etapie rozwoju i w których tkankach zachodzą zmiany?

1.3.2. Porównaj efektywność mikromacierzy i RNA-seq. Biorąc pod uwagę postęp w metodach sekwencjonowania, mikromacierze są metodą, która może mieć zastosowanie w diagnostyce medycznej?

Prof. dr hab. Roman Zieliński, prof.romanzielinski@gmail.com

2 z 5

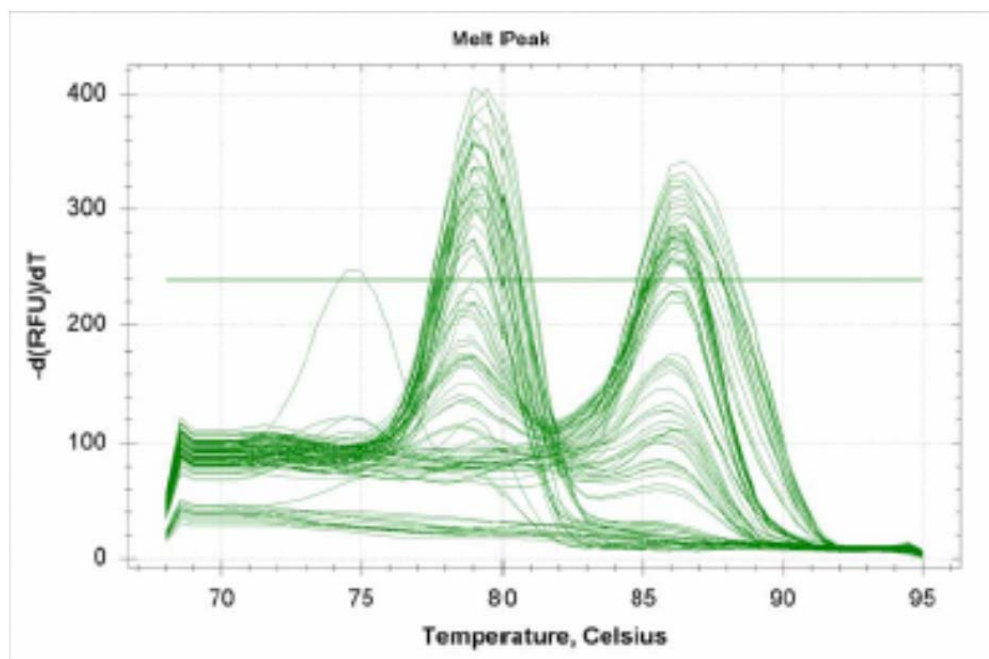
## 2. Real Time PCR (qPCR) i mikromacierze.

### 2.1. Pytania i zagadnienia

- 2.1.1. Jaka jest różnica między RT-PCR a Real Time PCR?
- 2.1.2. Jaki kwas nukleinowy jest matrycą w reakcji qPCR?
- 2.1.3. Na czym polega różnica między standardowym PCR a Real Time PCR?
- 2.1.4. Jak otrzymujemy cDNA?
- 2.1.5. Czy cDNA oznacza to samo co DNA genomowy? Uzasadnij odpowiedź.

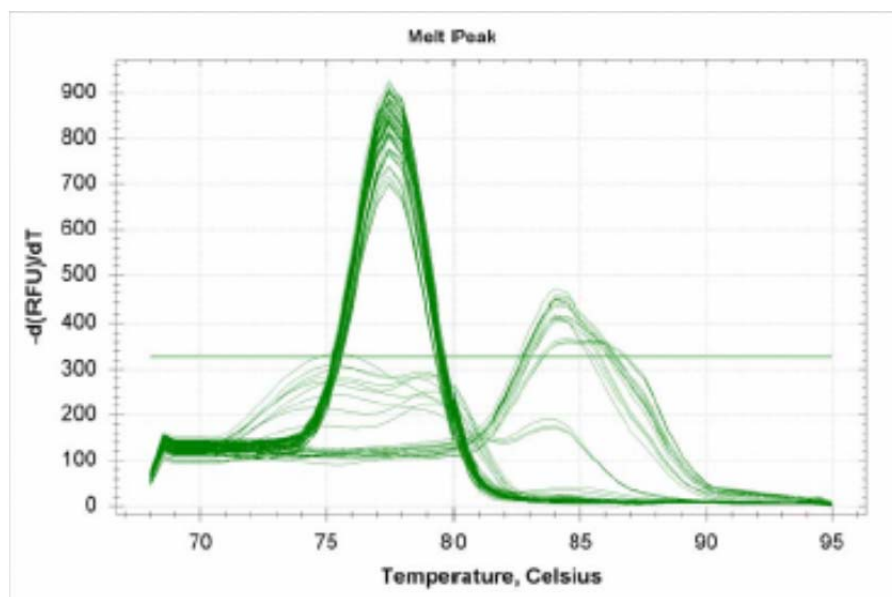
### 2.2. Ćwiczenia

- 2.2.1. Wykres poniżej przedstawia wynik reakcji Real Time u *Pinus cembra* oraz *P. pumilla*.



- Wiedząc, że w reakcji wykorzystano startery komplementarne do sekwencji genów rDNA, czy cDNA wykorzystane w reakcji Real Time PCR pochodziło z całkowitego RNA czy z mRNA?
- Kontrolę stanowiły próby pozbawione DNA. Zaznacz ją na rysunku.
- Zinterpretuj obecność dwóch wyraźnych „peaków”.

2.2.2. Na rysunku przedstawiono wynik reakcji Real Time PCR dla roślin transgenicznych. Startery były zaprojektowane na fragment transgenu.



- Czy transgen podlegał ekspresji u wszystkich roślin transgenicznych?
- Czym wytłumaczyć obecność dwóch peaków?

### 3. Analiza ekspresji genów u człowieka

#### 3.1. Ćwiczenia

3.1.1. Proszę wejść na stronę „Expression Atlas”, <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>. Po przewinięciu strony proszę wybrać „browse by species” oraz *Homo sapiens*.

The screenshot shows the Expression Atlas search interface. At the top, there is a search bar with the text "Gene set enrichment". Below the search bar, there is a section for "Gene / Gene properties" and "Species". The "Species" dropdown menu is set to "Any". Below this, there are "Search" and "Clear" buttons. Below the search bar, there are tabs for "By species", "Animals", "Plants", and "Fungi". Under the "By species" tab, there are three options: "Homo sapiens" (1232 experiments, B 41, D 1191), "Mus musculus" (1000 experiments, B 40, D 960), and "Arabidopsis thaliana" (533 experiments, B 6, D 527).

3.1.2. Po ukazaniu się tablicy z wyświetlonymi danymi proszę wybrać eksperyment: „The human skeletal muscle transcriptome – sex differences ...” (pojawia się jako 3-cia pozycja).

- Proszę wymienić 5 genów, które ulegają silniejszej ekspresji u kobiet.
- Proszę wymienić 5 genów, które ulegają silniejszej ekspresji u mężczyzn.
- Korzystając z bazy NCBI (baza gene) proszę podać charakterystykę dwóch genów, jednego o silnej ekspresji u kobiet, jednego u mężczyzn. Proszę w miarę możliwości podać:
  - lokalizację,
  - funkcję (typ kodowanego białka),
  - efekty mutacji w tym genie;
  - organy/tkanki, w których podlega najsilniejszej ekspresji (poza mięśniami).
  - 2-3 gatunki, u których występują ortologi genu.

***Samodzielne wykonanie ćwiczenia 3.1: 3 pkt.***

**3.2. Problemy**

- 3.2.1. Obecnie istnieje ogromna liczba danych dotyczących ekspresji genów u człowieka. Proszę się zastanowić na ile te dane są obecnie użyteczne w diagnostyce medycznej? Co ewentualnie trzeba zrobić aby były one bardziej użyteczne?
- 3.2.2. Dane z ekspresji genów pozyskano na ogół od ochotników. Jednakże coraz częściej (np. w USA) dąży się do pozyskiwania danych z całej populacji pod pretekstem kontrolowania przyjmowania leków lub wykorzystując aplikacje mobilne, które służą do pomiaru parametrów fizjologicznych np. w trakcie uprawiania amatorskiego sportu. Czy dążenia do pozyskiwania danych od całego społeczeństwa są etyczne?