

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 5.

Metody identyfikacji mutacji. Projektowanie starterów do metod PCR-RFLP i PCR-ARMS.

Ćwiczenia. Przeanalizuj próbki badane poszczególnymi metodami.

1. PCR-RFLP

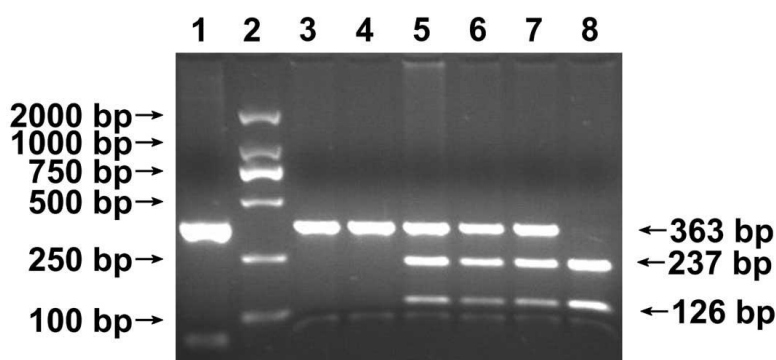


Figure 1 - Representative results for MutY homolog (MYH) rs3219476 polymorphisms(G/T) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods. The wild-type genotype T/T had no BtsCI site and was characterized by a 363 bp fragment, the variant genotype G/G was cut by BstCI leading to 237 and 126 bp fragments

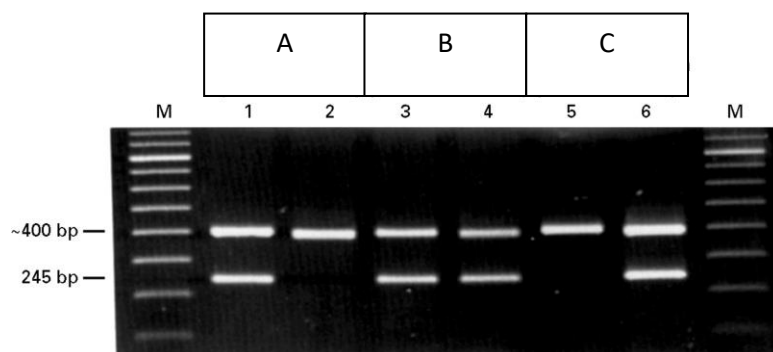
3-.....4-.....

5-.....6-.....

7-.....8-.....

2. ARMS, ASA

Na zdjęciu poniżej przedstawiono obraz elektroforetyczny analizy wykonanej metodą ASA-PCR. Próki 1-6 przedstawiają reakcje PCR wykonane dla 3(A-C) pacjentów, nieparzyste dla startera F komplementarnego z sekwencją dziką, a parzyste dla startera F komplementarnego z sekwencją zmutowaną. Produkt o długości ok. 400 pz, stanowi wewnętrzną kontrolę, informującą o prawidłowości przeprowadzonego PCR. Opisz próbki pacjentów.

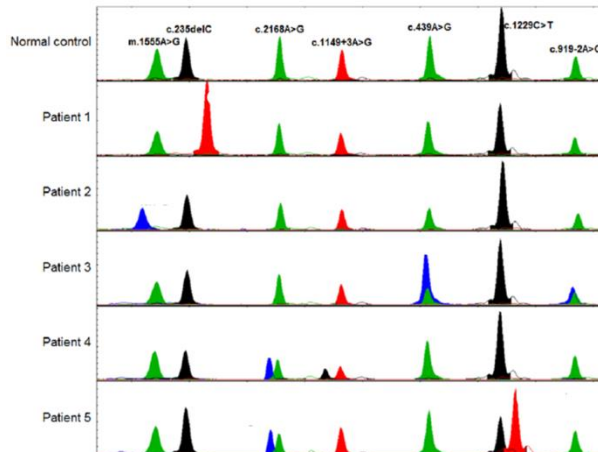


A-.....

B-.....

C-.....

3. SNAp-Shot



Na podstawie wyników sekwencjonowania stwórz uproszczony opis dla każdego pacjenta:

1:.....

.....

.....

2:.....

.....

.....

3:.....

.....

.....

4:.....

.....

.....

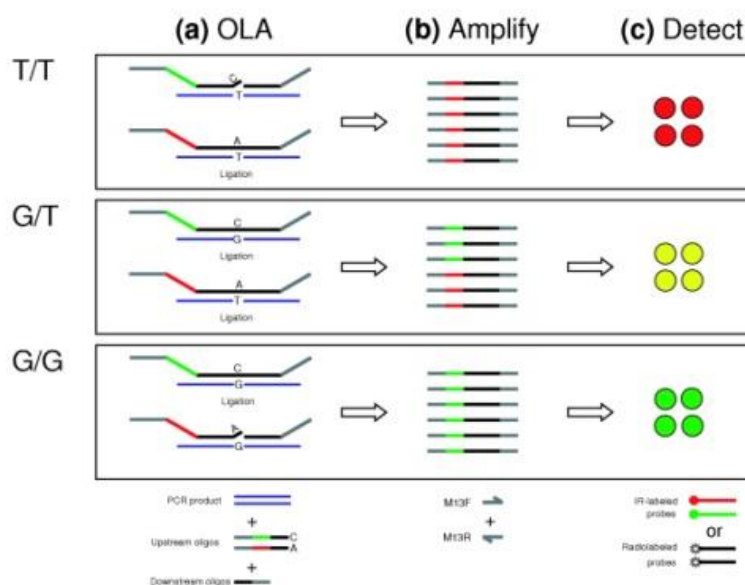
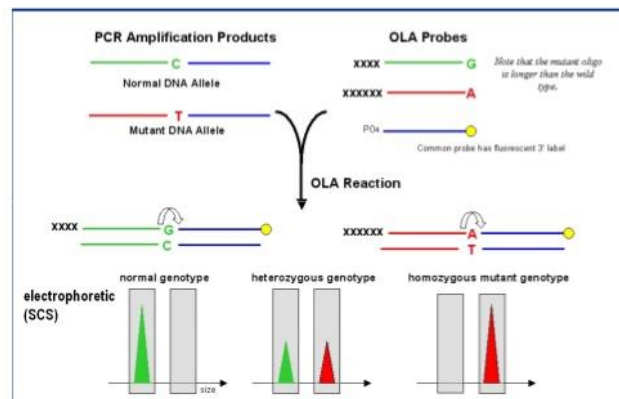
5:.....

.....

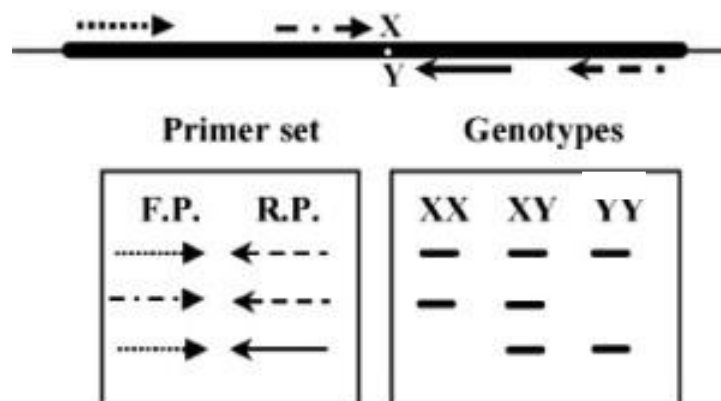
.....

4. OLA

Oligonucleotide ligation Assay

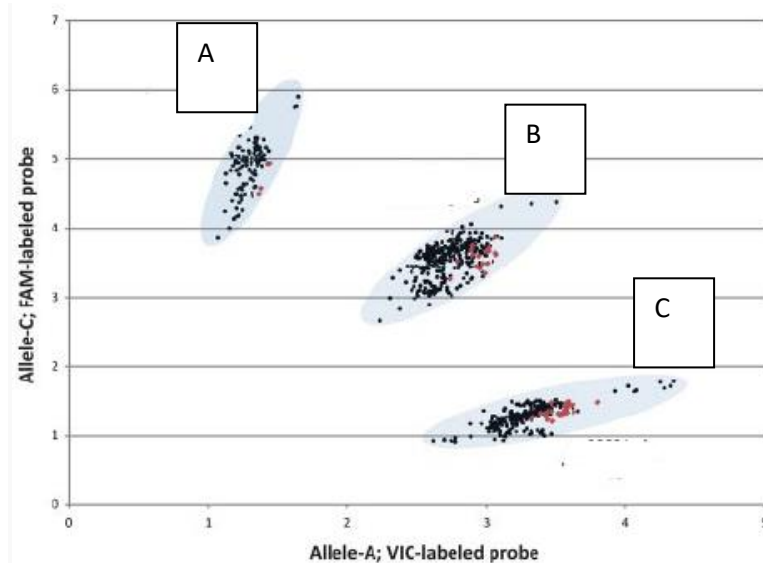


Ulepszona metoda TetraPrimer ARMS-PCR



5. Dyskryminacja alleli za pomocą sond TaqMan

Na podstawie wykresu poniżej opisz grupy pacjentów dla których wykonano analizę mutacji rs2221845 (mutacja w obrębie receptora IL6R A>C, Asp358Ala)



.....

.....

.....

.....

.....

6. Na podstawie baz danych NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> oraz COSMIC: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> proszę uzupełnić dane na temat SNP ludzkiego genu KRAS:

W bazie danych NCBI jest zidentyfikowanych (liczba) mutacji w obrębie tego genu.

Mutacja rs121913529 dotyczy mutacji punktowej na chromosomie....., w pozycji.....,

Mutacja ta odpowiada pozycjiw sekwencji CDS, gdzie G jest wymieniona na Sekwencja transkryptu z taką zmianą nukleotydową jest opisana Gene Banku (NCBI) pod numerem jako warianttranskryptu o długościbp.

Opisana zamiana nukleotydów nosi nazwę tranzycja/trans wersja (właściwie podkreślić).

Mutacja w tym miejscu skutkuje zamianą aminokwasu w aminokwas w pozycji białka. Dlatego taki rodzaj mutacji nazywamy

Ten rodzaj mutacji prowadzi do zwiększenia aktywności kinazy białkowej RAS, co może być jedną z przyczyn inicjacji procesu powstawania nowotworów.

Tego rodzaju mutacja występuje najczęściej w nowotworach

7. Zaplanuj doświadczenie

Na podstawie fragmentu sekwencji NG_008384.3 genu CYP2C19 z zaznaczonym eksonem 5 (na żółto), w którym znajduje się mutacja CYP2C19*2 (W sekwencji kodującej białko 681G>A- zaznaczona na czerwono), zaplanuj startery do reakcji PCR i trawienie enzymem restrykcyjnym wrażliwym na mutację.

```

24001 gtacaataaa aatttcccca tcaagatata caatatattt tatttatatt tatagtttta
24061 aattacaacc agagcttggc atattgtatc tataccttta ttaaagtgtt ttaatttaat
24121 aaattattgt tttctcttag atatgcaata attttccac tatcattgat tatttccc(g>a)g
24181 gaaccataa caaattactt aaaaaccttg cttttatgga aagtgatatt ttggagaaag
24241 taaaagaaca ccaagaatcg atggacatca acaaccctcg ggactttatt gattgcttcc
24301 tgatcaaaat ggagaaggta aaatgttaac aaaagcttag ttatgtgact gcttgcgat
24361 ttgtgattca ttgactagtt ttgtgtttac tacggatgtt taacaggtca aggagtaatg
24421 cttgagaagc atatttaagt ttttattgta tgcataaata tccagtaagc atcatagaaa

```

Starter forward 5'

Starter reverse 5'

Endonukleaza restrykcyjna, rozpoznająca sekwencję

Długości produktów trawienia PCR w przypadku homozygoty dzikiego typu (WW).....

Długości produktów trawienia PCR w przypadku heterozygoty z mutacją na jednym allele (WM).....

Długości produktów trawienia PCR w przypadku homozygoty z mutacjami na obu allele (MM).....

8. Na podstawie sekwencji z zadania 7 zaprojektuj startery do PCR- ARMS

Starter forward (mutant) 5'

Starter forward (dziki) 5'

Starter reverse 5'

Długość produktów PCR

Zaproponuj modyfikację doświadczenia 8 (z zaprojektowanymi starterami lub nowymi), tak aby możliwa była identyfikacja mutacji tylko w jednej reakcji PCR-ARMS.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....