

Cześć!

Poniżej zamieszczam 5 zadań, za które można uzyskać 30 punktów (+ 10 bonusowych). Nie trzeba rozwiązać wszystkich (szczególnie że są dość trudne). Rozwiązane zadania wgrajcie do systemu WWW do 30 maja. W razie pytań piszcie na maila: s78478@365.sum.edu.pl.

1. Reakcja qRT-PCR (10 pkt)

Pracujesz w laboratorium diagnostycznym COVID-19. Otrzymałeś 10 próbek izolatów RNA przepisanych na cDNA, kontrolę pozytywną (sekwencje plazmidową – fragment genu ORF1ab) oraz kontrolę negatywną (wodę wolną od nukleaz). W twoim laboratorium nie kupiono gotowego zestawu do diagnostyki, lecz zamówiono syntezę starterów i sondy (zgodnie z wytycznymi WHO) oraz kupiono osobno polimerazę wraz z niezbędnymi odczynnikami.

Do polimerazy dołączona była taka instrukcja:

<https://www.aabiot.com/pobierz?code=26e2d3a4950032cba2aa7ee0eeb9ddb6b9850dbd>

Natomiast do starterów i sond (które dotarły w formie liofilizowanej) dołączona była dokumentacja, poniżej jej fragmenty:

Sequence - SARS_CoV_2_P 250 n

5'- /56-ROXN/AGA TGT CTT GTG CTG CCG GTA /3IAbRQSp/ -3'

Properties	Amount Of Oligo
<i>T_m</i> (50mM NaCl)*: 58.7 °C	3.0 = 11.3 = 0.09
GC Content: 52.4%	OD ₂₆₀ nmoles mg
Molecular Weight: 7,842.6	For 100 µM: add 113 µL
nmoles/OD ₂₆₀ : 3.8	
ug/OD ₂₆₀ : 29.5	
Ext. Coefficient: 265,906 L/(mole·cm)	

Sequence - SARS_CoV_2_R

5'- CTC CCT TTG TTG TGT TGT -3'

Properties	Amount Of Oligo
<i>T_m</i> (50mM NaCl)*: 50.1 °C	7.6 = 49.6 = 0.27
GC Content: 44.4%	OD ₂₆₀ nmoles mg
Molecular Weight: 5,453.6	For 100 µM: add 496 µL
nmoles/OD ₂₆₀ : 6.6	
ug/OD ₂₆₀ : 35.8	
Ext. Coefficient: 152,500 L/(mole·cm)	

Sequence - SARS_CoV_2_F

5'- ATG AGC TTA GTC CTG TTG -3'

Properties	Amount Of Oligo
<i>T_m</i> (50mM NaCl)*: 48.8 °C	5.4 = 31.4 = 0.17
GC Content: 44.4%	OD ₂₆₀ nmoles mg
Molecular Weight: 5,520.6	For 100 µM: add 314 µL
nmoles/OD ₂₆₀ : 5.9	
µg/OD ₂₆₀ : 32.3	
Ext. Coefficient: 170,900 L/(mole·cm)	

Wskazówka: ostatnia literka w nazwie sekwencji wskazuje czym jest – F – primer forward, R – primer reverse, P – probe (sonda)

Dysponujesz niezbędnym sprzętem laboratoryjnym, wodą wolną od nukleaz i buforem TEA (do rozcieńczania sond/starterów).

Wskazówka: objętość pojedynczej reakcji w twoim termocyklerze to 10 µL; koledzy z laboratorium zmierzili stężenie DNA w próbkach pacjentów i wyniosło średnio 0.010 µg/µL.

Opisz tok postępowania do przeprowadzenia reakcji qRT-PCR kierując się instrukcją. Podając odczynniki podaj stosowaną objętość. Nie musisz opisywać sposobu programowania termocyklera.

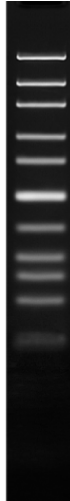
2. Zabawa z genomem (10 pkt)

Otwórz genom wirusa SARS-CoV-2 (ACCESSION: NC_045512), ustal lokalizacji sekwencji komplementarnych do starterów reverse i forward, podaj długość i lokalizacje w genomie (pozycje np. 1500-1700) amplikonu z zadania pierwszego.

3. Elektroforeza produktu (5 pkt)

Po przeprowadzeniu reakcji PCR w zadaniu 1 wykonałeś elektroforezę produktu w żelu agarozowym. Równocześnie w sąsiednim dołku umieściłeś tzw. drabinę, czyli roztwór wzorcowych fragmentów DNA umożliwiających określenie długości twojego produktu. Na podstawie długości amplikonu wyliczonego w zadaniu 2 (jeśli się nie udało to przyjmij 200bp) narysuj miejsce, w którym spodziewasz się prążka twojego produktu.

Roztwór drabinki zawiera fragmenty o długości: 10, 15, 20, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200, 300 bp. Bieg elektroforezy rozpoczął się od góry.



4. Biopython (5 pkt)

Korzystając z pakietu Biopython przygotuj program, który po wpisaniu sekwencji DNA poda jej długość (w bp) oraz wyliczy % udział zasad GC.

5. Bonus (10 pkt)*

W tym zadaniu musisz po prostu poszukać informacji, ale można dostać ekstra punkty.

1. Polimeraza Taq pozyskiwana jest z bakterii o nazwie...
2. DNA w komórce ludzkiej zlokalizowane jest w ... i ...
3. Proces translacji zachodzi w ...
4. Przykładem metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS) jest...
5. Zasady azotowe występujące w RNA to: ..., ..., ... i ...