**Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών**

**1η Εργαστηριακή Άσκηση**

**«Βιοπληροφορική»**

**Γκαραγκούνης Κωνσταντίνος**

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

**2018**

Πώς χρησιμοποιούμε τις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων για να ταυτοποιήσουμε διαγονιδιακές σειρές ένθεσης (mutant lines) του φυτού *Arabidopsis thaliana* και να σχεδιάσουμε εκκινητές για να ελέγξουμε με PCR το γονότυπο των φυτών.

**Σκοπός:** Σε αυτό το εργαστήριο θα μάθετε πώς να χρησιμοποιείτε ορισμένες από τις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων του *Arabidopsis* για να εντοπίσετε γονίδια που σας ενδιαφέρουν, να ταυτοποιήσετε πολυμορφισμούς και ενθέσεις T-DNA σε γονιδιακούς τόπους, να παραγγείλετε διαγονιδιακές σειρές ένθεσης T-DNA από τo NASC και να σχεδιάσετε εκκινητές και για να ελέγξετε το γονότυπο αυτών των φυτών με PCR.

**Εισαγωγή:** Υπάρχουν πολλές βάσεις δεδομένων μέσω των οποίων μπορείτε να αντλήσετε πληροφορίες για τα γονίδια που σας ενδιαφέρουν σε πολλά είδη. Αυτές οι βάσεις δεδομένων ποικίλουν από απλές βάσεις που περιέχουν αλληλουχίες DNA και πρωτεϊνών μέχρι μεγάλους ιστοτόπους που περιλαμβάνουν πολλά είδη πληροφοριών σχετικά με το γονίδιο που σας αφορά (gene of interest – GOI). Ο ιστότοπος TAIR (The Arabidopsis Information Resource) είναι μία από τις καλύτερα ενημερωμένες βάσεις δεδομένων και παρέχει συνδέσμους πρόσβασης (links) σε άλλες χρήσιμες ιστοσελίδες. Σε αυτήν την άσκηση θα χρησιμοποιήσετε τη βάση TAIR για να ταυτοποιήσετε ένα γονίδιο που σας αφορά, να αντλήσετε πληροφορίες σχετικά με τη δομή του γονιδίου και τη θέση του στο γονιδίωμα, να εντοπίσετε τις κατάλληλες σειρές ένθεσης T-DNA για το συγκεκριμένο γονίδιο, να παραγγείλετε τις σειρές αυτές από έναν οργανισμό που προμηθεύει αυτού του είδους σπέρματα και να σχεδιάσετε εκκινητές με τους οποίους θα πραγματοποιήσετε έλεγχο του γονοτύπου με PCR στις σειρές που έχετε παραγγείλει.

Το γονίδιο με το οποίο δουλεύετε (GOI) σε αυτήν την άσκηση είναι ένα ισόμορφο της κυτταροδιαλυματικής αλδολάσης του Arabidopsis που κωδικοποιείται από το γενετικό τόπο *At3g52930*. Παρακάτω παρέχονται οι οδηγίες για το πώς θα βρείτε πληροφορίες σχετικά με αυτό το γονίδιο.

**Μέθοδος:**

**I)** Χρησιμοποιούμε τον ιστότοπο The Arabidopsis Information Resource (TAIR) για να βρούμε μεταλλάγματα ένθεσης για ένα γονίδιο που μας αφορά.

**1.** Αναζητήστε στη μηχανή αναζήτησης Google τη βάση δεδομένων TAIR ή πληκτρολογήστε το URL: https://[www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) στο browser.

**2.** Στην άνω δεξιά γωνία της ιστοσελίδας θα δείτε ένα παράθυρο «Αναζήτησης» και ένα μενού επιλογών που ανοίγει προς τα κάτω, δίπλα του. Η λέξη «Gene» θα πρέπει να έχει οριστεί ως προεπιλογή σε αυτό το μενού. Περιηγηθείτε στη λίστα προκειμένου να δείτε τις άλλες επιλογές που υπάρχουν.

**3.** Με τη λέξη «Gene» επιλεγμένη, σε αυτό το μενού, πληκτρολογήστε At3g52930 στο κουτί αναζήτησης και πατήστε επιστροφή, ή επιλέξτε «Αναζήτηση».

Η μηχανή αναζήτησης θα πρέπει να εμφανίσει δύο gene identifiers (GI’s). Και οι δύο είναι αλδολάσες με παρόμοια επισήμανση αλλά κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους.

**4.** Επιλέξτε το GI *At3g52930* ξανά για να πλοηγηθείτε σε μια σελίδα που παρέχει πληροφορίες σχετικά με αυτόν το γονιδιακό τόπο. Παρατηρείστε τους διάφορους τύπους πληροφοριών που διατίθενται ειδικά για αυτό το ισοένζυμο αλδολάσης.

**5.** Σύρετε προς τα κάτω για να μεταβείτε στις επιλογές “Polymorphism” και “Germplasm”. Θα δείτε μια λίστα από μεταλλάγματα ένθεσης τα οποία έχουν δημιουργηθεί συγκεκριμένα για αυτόν το γονιδιακό τόπο. Παρατηρείστε τους διαφορετικούς τύπους των διαγονιδιακών σειρών ένθεσης (GK, SALK, και SAIL) καθώς επίσης και ότι ορισμένες σειρές δεν είναι πια διαθέσιμες για παραγγελία από τα κέντρα που διαθέτουν τους συγκεκριμένους σπόρους.

Το ίδιο μπορείτε να κάνετε με οποιοδήποτε GOI, όχι μόνον την αλδολάση, για να κάνετε τις δικές σας υποθέσεις και να σχεδιάσετε τα δικά σας πειράματα.

**II) Ταυτοποίηση του καταλλήλου μεταλλάγματος ένθεσης χρησιμοποιώντας το T-DNA express**

Οι ενθέσεις που βρήκατε να περιέχονται στις διαγονιδιακές σειρές παραπάνω δεν εντοπίζονται όλες στην κωδική αλληλουχία του γονιδίου *At3g52930*, αυτό μπορεί να οδηγήσει συχνά σε μερική ή καθόλου σίγηση ή ακόμα και σε υπερέκφραση του γονιδίου-στόχου. Τώρα είναι απαραίτητο να βρείτε ποιες διαγονιδιακές σειρές ένθεσης εντοπίζονται στην κωδική αλληλουχία της αλδολάσης και ως εκ τούτου είναι πιθανότερο να προκαλέσουν σίγηση του γονιδίου.

**1)** Στην ίδια σελίδα, σύρετε προς τα κάτω στην επιλογή “External link”.

**2)** Επιλέξτε το “T-DNA Express” από τη λίστα αυτή. Μία νέα καρτέλα περιήγησης θα πρέπει να ανοίξει με ένα σχηματικό χάρτη του γονιδιώματος του Arabidopsis κοντά στη γονιδιακή θέση *At3g52930*. Η πλατιά, μπλε γραμμή απεικονίζει το χρωμόσωμα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αναπαρίστανται πάνω από αυτήν τη γραμμή με πράσινα, διακεκομμένα βέλη τα οποία αντιπροσωπεύουν τα γονιδιακά μοντέλα και τον προσανατολισμό, forward (προς τα εμπρός) και reverse, (αντίστροφα), ανάλογα με το σημείο έναρξης του γονιδίου. Κάτω από το «χρωμόσωμα» αναπαρίστανται οι διάφορες ενθέσεις και οι πολυμορφισμοί που διατίθενται για κάθε περιοχή.

**3)** Έχοντας ταυτοποιήσει μία ή δύο διαγονιδιακές σειρές SALK στο Βήμα 1, προσπαθήστε να δείτε πού αυτές οι ενθέσεις σχετίζονται με το γονιδιακό μοντέλο της αλδολάσης. Μπορείτε να εντοπίσετε ενθέσεις σε κάποιο από τα εξώνια;

Εάν θα θέλατε να παραγγείλετε σπόρους για μία από αυτές τις δύο διαγονιδιακές σειρές, αντιγράφετε το identifier number της διαγονιδιακής σειράς SALK και την παραγγέλνετε από ένα εκ των κέντρων που διαθέτουν τους σπόρους (ABRC για τις ΗΠΑ ή NASC για την Ευρώπη).

**4)** Αναζητήστε στο Google τη NASC και πλοηγηθείτε στην «Αναζήτηση» ή απευθείας πληκτρολογήστε: <http://arabidopsis.info/BasicForm>, στο δικό σας περιηγητή.

**5)** Αντιγράψτε το identifier για τη διαγονιδιακή σειρά που βρήκατε στο παράθυρο αναζήτησης και πατήστε την εντολή “Go”.

**6)** Στα αποτελέσματα της αναζήτησής σας θα πρέπει να δείτε έναν πίνακα με διάφορους τύπους αποτελεσμάτων. Επιλέξτε τον αριθμό στη στήλη “Number of Hits” στη σειρά “ABRC code”.

Στη σελίδα που προκύπτει θα δείτε πληροφορίες σχετικά με τη σειρά που επιλέξατε και αν είναι διαθέσιμη για αποστολή.

**ΙΙΙ) Σχεδιάζοντας εκκινητές για έλεγχο γενότυπου συγκεκριμένων σειρών ένθεσης T-DNA χρησιμοποιώντας το Salk T-DNA Primer Design**

**1)** Στο T-DNA Express map view επιλέξτε τη σειρά Salk: SALK\_124383. Στη νέα καρτέλα που ανοίγει, επιλέξτε και αντιγράψτε το identifier number της διαγονιδιακής σειράς ένθεσης. Πηγαίνετε πίσω στην καρτέλα T-DNA Express που απεικονίζει το χάρτη του χρωμοσώματος. Σύρετε προς τα κάτω ώσπου να δείτε την επιλογή “Tools” στα δεξιά. Επιλέξτε το “iSect Primers” κάτω από την επιλογή εργαλεία. Θα οδηγηθείτε σε μια σελίδα με τίτλο: “T-DNA Primer Design”.

Θα πρέπει να δείτε κάποιες σημειώσεις και ένα διάγραμμα του πρωτόκολλου για το σχεδιασμό T-DNA εκκινητών και για τις genotyping PCRs. Οι εκκινητές που προσδένονται στο T-DNA ένθεμα είναι οι ίδιοι για όλες τις διαγονιδιακές σειρές Salk. Θα πρέπει να σχεδιάσετε συγκεκριμένους εκκινητές, οι οποίοι να περιβάλλουν το σημείο ένθεσης στο γονίδιο που σας ενδιαφέρει (GOI).

**2)** Για να το πετύχετε αυτό, επικολλήστε το identifier number (αριθμός ταυτοποίησης) για τη διαγονιδιακή σειρά, ή πληκτρολογήστε οι ίδιοι SALK\_124383 στο κενό κουτί κάτω από την κεφαλίδα “SALK T-DNA verification primer design”. Επιλέξτε “Submit” για την υποβολή. Θα πρέπει στη σελίδα των αποτελεσμάτων να εμφανίζεται το identifier number της επιλεγμένης διαγονιδιακής σειράς, το αναμενόμενο του προϊόντος που οι εκκινητές, τους οποίους βρήκαμε, θα πρέπει να δώσουν στην PCR, θερμοδυναμικά δεδομένα για το ζεύγος των εκκινητών και έπειτα τις αλληλουχίες και εξειδικευμένα θερμοδυναμικά δεδομένα για τους δύο πλευρικούς εκκινητές που σχεδιάσατε.

Το λογισμικό κατά γενική ομολογία επιλέγει τους σωστούς εκκινητές, παρόλα αυτά είναι σημαντικό να ελέγξετε διπλά ότι είναι όντως κατάλληλοι.

**3)** Σε μια νέα καρτέλα του περιηγητή αναζητήστε στο Google “NCBI primer BLAST” ή πληκτρολογήστε <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

**4)** Αντιγράψτε και επικολλήστε τις δυο αλληλουχίες των πλευρικών εκκινητών μέσα στα κουτιά κάτω από την ένδειξη “Primer Parameters”.

**5)** Σύρετε προς τα κάτω έως την ένδειξη “Primer Pair Specificity Checking Parameters” και επιλέξτε “nr” από το dropdown μενού επιλογών δίπλα από τη “Database” και πληκτρολογήστε *Arabidopsis thaliana* (Taxid: 3702) στο κουτί με την ένδειξη “Organism”. Επιλέξτε “Get Primers”.

Εάν οι εκκινητές που σχεδιάσατε είναι καλοί, θα πρέπει να λάβετε πίσω ένα μοναδικό προϊόν στον γονιδιακό τόπο *At3g52930*.

Εφόσον πραγματοποιήσατε αυτό το εργαστήριο, αυτό που πρέπει να κάνετε από εδώ και στο εξής είναι να παραγγείλετε τους εκκινητές που βρήκατε, να παραγγείλετε έναν από τους εξειδικευμένους T-DNA εκκινητές από την προηγούμενη ιστοσελίδα και να αγοράσετε τους σπόρους για την επιθυμητή διαγονιδιακή σειρά (Salk line) από ένα εκ των κέντρων που τις προμηθεύουν.