PCR praimerite automaatne grupeerimine

Keskastme lõputöö

Meelis Olev

Töö valmimise põhjused 1

- PCR (polümeraasahelreaktsioon) – kindlate genoomis esinevate järjestuste (nt. SNP-sid ümbritsevad alad) paljundamiseks (võimendamiseks) ning detekteerimiseks
- Kui uuritavaid järjestusi on palju ning genoomset materjali vähe, on kasulik multipleks-PCR e. reaktsiooni läbiviimine mitme praimeripaariga

Töö valmimise põhjused 2

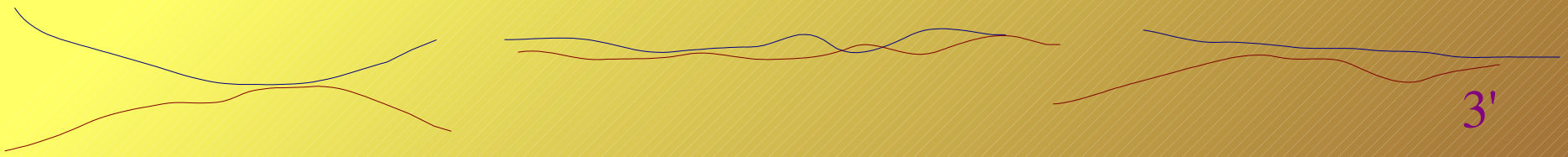
- Multipleks-PCRi läbiviimist piiravad nt. praimerite ja produktide üksteisega ja omavahel seondumiste tugevused, produktide pikkuse erinevused
- Suvalisi praimeripaare ei saa alati kasutada koos, korraga uuritavate lookuste hulk on piiratud
- Suure hulga lookuste korral on oluline saada sarnase suurusega grupid

Programm Multiplx

- Jaotab sisendiks saadud praimeripaarid gruppidesse, arvestades kasutaja piiranguid grupi suurustele
- Praimeripaaride kokkusobivuse hindamiseks suudab arvestada järgmiste kriteeriumitega:
  - praimerite ja produktide vahelised seondumised (lokaalse ja globaalse ning 3' lõpust lähtuva joonduse põhjal)
  - produkti pikkus ja pikkuse erinevus
  - kasutaja poolt antud lisandprogrammi (*plugin*) poolt saadud sobivuse hinnang

Oligonukleotiidide seostumine

- Lokaalne joondus – Needleman-Wunchi algoritm, leitakse suvalise pikkusega suvalisest kohast algav kattuv lõik, mis on kõige sarnasem
- Globaalne joondus – püüab oligonukleotiidid “kokku sobitada” võimalikult täies ulatuses
- 3'-joondus – püütakse leida parim seostumine, mille siis jääb vähemalt ühe oligonukleotiidid 3' ots



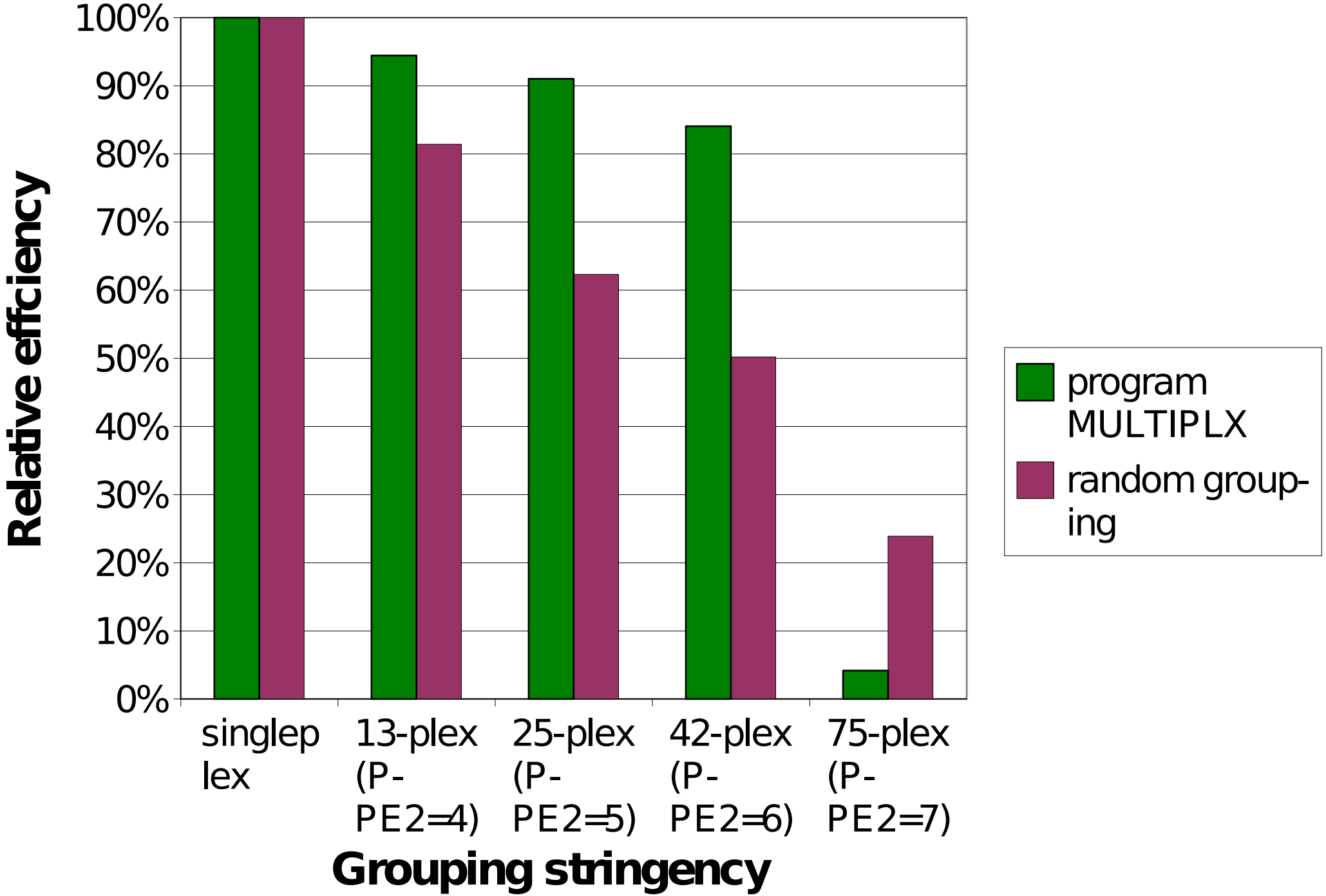
Grupeerimismetoodika

- Püüab praimeripaarid paigutada gruppidesse, kuhu nad sobivad (ei ületa kasutaja poolt antud piire) ega ületa maksimaalset grupi suurust
- Hiljem püütakse minimaalsest väiksema suurusega grupid täita elementidega minimaalsest suurematest gruppidest pärit elementidega
- Soovi korral on võimalik grupeerimist läbi viia juhuslikus järjekorras valitud praimeripaaridena ning paljukordselt

Programmi hindamine

- Katrin Kepp võrdles programmi grupeerimise efektiivsust laboris võrreldes juhuslikult gruppidesse paigutamisega (vt. diagramm - valenegatiivsete vastuste hulk)
- Mõistliku suurusega gruppide korral märgatavalt väiksem valenegatiivsete ja valepositiivsete signaalide hulk
- Kasutatavad gruppi sobivuse kriteeriumid – praimer/praimer globaalne, praimer/praimer 3', praimer/praimer lokaalne, praimer/produkt lokaalne

Relative efficiency of grouping comparing to singleplex PCR



Programmi hindamine 2

- Praimeripaaride kokkusobivuse hindamiseks arvutatavate seostumistugevuste leidmine on aeganõudev ning kasvab enam kui ruutvõrdeliselt praimeripaaride arvuga
- Kõige aeganõudvam on produktidega seondumiste arvutamine, kuna produktid on pikad
- Grupeerimine toimub kiiresti – nt. 11 praimeripaari korral 4 seostumisparameetri arvutamine ~13 s, 100 000-kordne juhuslik grupeerimine ~2.6 s

Teie poolt, lugupeetud kuulajad...

Oponendi arvamus ning kuulajate küsimused

Tänud

- prof. Maido Remm
- Tarmo Puurand
- Tõnu Margus
- Reidar Andreson
- Triinu Kõressaar
- Lauris Kaplinski