

# המחלקה להנדסת תוכנה פרויקט גמר – תשע"ו DNA -בנאי פריימרים ל DNA PRIMER BUILDER

#### :מאת

אמיר ארז - 203822248 אור ברדוגו - 302891551

מנחה אקדמי: ד"ר יהודה חסין אישור: תאריך:

רכז הפרויקטים: מר אסף שפיינר אישור: תאריך:

	מיקום	מערכת	#
github.com/erezam/DNA-PRIMER-BUILDER		מאגר קוד	1
https://github.com/erezam/DNA-PRIMER-		יומן	2
BUILDER/wiki/Project-Diary			
		ניהול פרויקט	3
		(אם בשימוש)	
		הפצה	4



# תוכן עניינים

3	מילון מונחים:
4	מבוא
5	תיאור הבעיה
5	דרישות ואפיון הבעיה
6	הבעיה מבחינת הנדסת תוכנה
6	תיאור הפתרון
6	מהי המערכת
8	Sequence diagram
9	הפתרון המוצע
9	הכלים המשמשים לפתרון
10	סקירת עבודות דומות בספרות והשוואה
14	נספחים
14	רשימת ספרות \ ביבליוגרפיה
14	תכנון הפרויקט
15	טבלת סיכונים
16	נובלת דבוועות



## מילון מונחים:

- מולקולת ענק המורכבת ממספר רב של נוקליאוטידים המאורגנים במבנה של סליל כפול. כל המידע התורשתי הדרוש לבניית החלבונים בתא אצל כל האורגניזמים הידועים, מחיידקים ועד לבני אדם, מוצפן באחת או יותר מולקולות DNA שרצף הנוקליאוטידים בהן מיוחד לכל אורגניזם.
  - נוקליאוטידים קבוצה של תרכובות אורגניות. הנוקלאוטידים נמצאים בכל היצורים החיים, ומרכיבים, בין השאר, את החומר התורשתי. מיוצגים באותיות T,A,G,C
    - .DNA-ם מקטע קצר של חומצת גרעין המסייע בתהליך שכפול ה-DNA
- מוטציה הוא מונח בביולוגיה המתאר שינוי ברצף הנוקלאוטידים ב-DNA, דהיינו, שינוי בהרכב הגנטי של יצור מסוים. שינוי כזה עשוי להביא לשינוי באחת או יותר מתכונות היצור החי.
  - PCR היא שיטה מעבדתית המשמשת לשכפול מזורז של מקטעי DNA.
    נהוג להשתמש ב-PCR לסריקה אחר מחלות גנטיות ולביצוע ניתוח השוואתי של DNA מאוכלוסיות שונות.
    - אקסון רצף נוקלאוטידים ב-DNA המהווה חלק מגן ואשר מקודד לחומצות אמינו. שאר חלקי הגן אשר אינם מקודדים לייצור חלבון קרויים אינטרונים.
- טרנסקריפט Transcript תהליך בביולוגיה של התא שבו מולקולת RNA מיוצרת לפי תבנית של מולקולת DNA , חיבור כל האקסונים בגן מסוים.



#### מבוא

הפרויקט מבוצע כפרויקט מחקרי בשיתוף עם פרופי \_\_\_\_\_ מבית החולים שיבא.

הפרויקט עוסק בתוכנה לבניית פריימרים לבדיקות גנטיות ב- DNA במכונת PCR.

? מהו פריימר

ּתֶּחֶל (באנגלית: Primer; בתעתיק לעברית לעתים, במיוחד בעגה המדעית: פְּרָיימר) הוא מקטע קצר של חומצת גרעין המסייע בתהליך שכפול ה-DNA.

אורכו של התחל הוא כ-20 נוקלאוטידים. הסיבה לקיומו היא אי-יכולתו של האנזים DNA פולימראז להתחיל ביצירת גדיל חדש של DNA; האנזים, האחראי על שכפול DNA בתא, מסוגל אך ורק להאריך גדיל DNA קיים. התחל מספק לאנזים נקודת התחלה ליצירת גדיל חדש.

תחלים מיוצרים באופן מלאכותי על ידי חברות ביוטכנולוגיה ומשמשים רבות בשיטות בגנטיקה ובביולוגיה מולקולרית, כדוגמת PCR.

PCR היא שיטה מעבדתית המשמשת לשכפול מזורז של מקטעי DNA.

נהוג להשתמש ב-PCR לסריקה אחר מחלות גנטיות ולביצוע ניתוח השוואתי של DNA מאוכלוסיות שונות, כולל DNA ממינים נכחדים. השיטה חיונית לפענוח פשעים ולקביעת אבהות.

עקרון הפעולה של המכשיר כולל 3 שלבים בכל מחזור: פרימה (Denaturation; דנטורציה בחום), איחוי (איחוי של הְּמָלִים (פּריימרים) מתאימים לקצוות המקטע שאותו רוצים לשכפל והארכה (Annealing) של תְּחָלִים (פּריימרים) מתאימים לקצוות המקטע שאותו רוצים לשכפל והארכה (Elongation) באמצעות אנזים DNA פולימראז העמיד לחום, המכונה Taq DNA פולימראז. המכשיר חוזר על שלבים אלו, של מחזור ההכפלה, כמה עשרות פעמים (בדרך כלל 25-30), עד להגברה המבוקשת של המקטע.

התוכנה שנבנה בפרויקט תבנה פריימר (סטרינג באורך של 13-28 תווים) בהתאם לדרישה לחיפוש גן מסוים במכונת PCR , לבניית הפריימר מספר אילוצים בהם נעסוק בהמשך.

התוכנה תבנה כאפליקציית רשת הפתוחה לשימוש פומבי ותיעזר במאגרי מידע קיימים לנתונים הנחוצים על הADD .



#### תיאור הבעיה

הבעיה הקיימת הינה מציאת פריימר מתאים עבור בדיקה גנטית במכונת PCR .

הסביבה בה קיימת הבעיה היא בתחום המחקר והרפואה.

#### דרישות ואפיון הבעיה

תת פרק זה מכיל אפיון של הדרישות מנקודת מבט המשתמש. למשל עבור פרויקט המציג מסכים ותפריטים למשתמש – תת פרק זה יתאר את המסכים העיקריים.

הנספח יכיל את רשימות הדרישות מהפרויקט.

כאשר רופא או חוקר מעוניין לבצע שימוש במכונת PCR עליו למצוא פריימר מתאים לבדיקה. כיום ישנן מספר דרכים למציאת הפריימר המתאים:

- מנועי חיפוש לפריימרים ידועים , עבור גנים שהחיפוש שלהם שכיח קיימים פריימרים תקינים וידועים.
- תוכנות לבניית פריימרים , תוכנות לבניית פריימרים בהתאם לגן ודרישות מסוימות.
  - בניה ידנית של פריימר.

הפריימר הוא למעשה 2 פריימרים, forward primer ו reverse primer בהם משתמשים בבדיקה. לצורך מציאת פריימר מתאים לגן יש צורך לעמוד במספר אילוצים:

- 1. אורך הפריימר צריך לנוע בטווחים של 13-28 אותיות, כאשר 20 אותיות הוא האורך האופטימלי.
  - Junction Exon 40%-60 .2
- 3. טמפרטורה Tm צריכה לנוע בין 60-70 מעלות צלזיוס, כאשר הטמפרטורה האופטימלית היא 65.
  - reverse primer לבין ה forward primer מ ל מעלות בין ה לבין ה 4.
    - .60%-40% הם 2 נקלאוטידים) צריך לנוע בטווח של G,C) GC אחוז קשרי ה.5
      - 6. אמפליקון 1200-50 ייי
        - alighment בדיקת ה.7
      - .8 הפריימר לא יתחיל בנוקלאוטיד 8.
      - 9. אסור שהפריימר יכיל רצף של G 4 ויותר.
      - 10. אסור שהפריימר יכיל רצף של A 6 ויותר.
      - 11. אסור שהפריימר יסתיים ברצף GGAG או 11
        - CC אסור רצף של .12

כאשר מדובר בבנייה ידנית או בבנייה בעזרת תוכנה קיימת שלא מצאה פריימר לגן, יש צורך לבצע "משחק" בטווחי הפרמטרים השונים של האילוצים על מנת לנסות למצוא פריימר, בגלל ריבוי האילוצים והטווחים הקיימים בכל אילוץ דבר זה עשוי לקחת זמן רב.

הבעיה היא מציאת הפריימר ה"אופטימלי" ללא התערבות אדם.

כלומר, פריימר העומד בכל האילוצים ומתחשב גם במוטציות של הגן הנבדק ושנמצא רק על ידי התוכנה ללא שינוי ידני של פרמטרי האילוצים.



#### הבעיה מבחינת הנדסת תוכנה

מבחינת הנדסת תוכנה, אפשר להתייחס למקטעים ב DNA(בין השאר גנים) כסטרינג. הבעיה המרכזית מבחינת הנדסת תוכנה תהיה בניית האלגוריתם לבדיקת העמידה באילוצים. קיימים 18 אילוצים על הפריימר (סטרינג) שנרצה להרכיב. האלגוריתם יידרש למצוא את הפריימר בזמן סביר (שעות עד ימים). התוכנה תבדוק טווחים שונים של אילוצים ותציג באילו טווחים הפריימר שנמצא עומד. כמו כן נתחבר למסדי נתונים חיצוניים בכדי למשוך מידע על רצפי הDNA ועל מוטציות מוכרות, יש צורך לבדוק כיצד להתחבר בעזר ה API של האתרים, ולשלוף את המידע הרצוי.

#### תיאור הפתרון

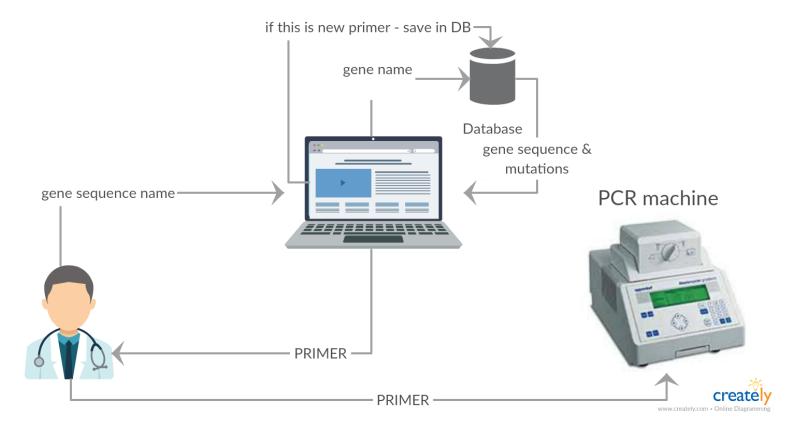
#### מהי המערכת

התרשימים הבאים מתארים את תהליך העבודה בבדיקה הגנטית בעזרת התוכנה שלנו:

- 1. החוקר/הרופא מזין לאתר את שם הגן אותו הוא מעוניין לבדוק.
- 2. התוכנה שלנו פונה למסד הנתונים לקבלת רצף הגן המבוקש והמוטציות המוכרות שלו.
  - 3. התוכנה תבדוק האם קיים פריימר לגן המבוקש.
  - 4. במידה ולא קיים פריימר, התוכנה תבנה את הפריימר בעזרת האלגוריתם.
  - 5. התוכנה תחזיר לחוקר את הפריימר המבוקש ודוח לגבי הסטיות באילוצים.
- 6. נבדוק אפשרות לבצע שמירה של הפריימר שנוצר בעזרת המערכת על מנת למנוע עבודה חוזרת של התוכנה על גן עליו בוצע חיפוש בעבר.
  - 7. החוקר ישתמש בפריימר במכונת הPCR להמשך הבדיקה.

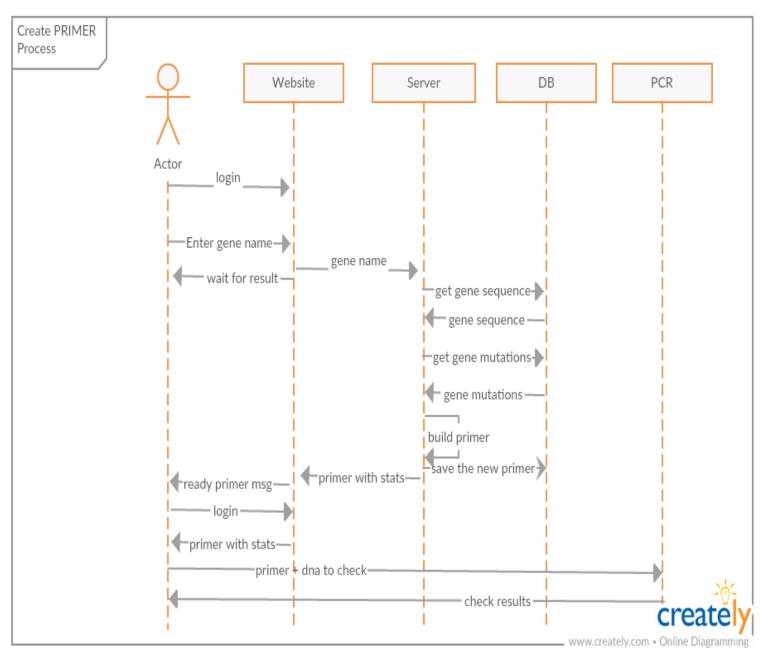


# : תרשים תפקידים כללי





# Sequence diagram



תיאור התרחישים על ציר זמן.



#### תיאור הפתרון המוצע

הפתרון המוצע יכלול אתר אינטרנט שיהיה נגיש לכל אחד, באתר יוזן שם של גן לפי קונבנציה מסוימת עליה נחליט (כיום יש מספר קונבנציות לשמות הגן).

לאחר הזנת השם התוכנה תבצע בדיקה האם קיים פריימר עבור הגן הנ״ל, במידה ולא קיים התוכנה מאחר הזנת השם התוכנה באותו גן, כרגע ככל הנראה מהאתר תשלוף בעזרת API את רצף הגן ואת המוטציות המוכרות באותו גן, כרגע ככל הנראה

ensembl, התוכנה תבצע עיבוד של הנתונים ויצירת הפריימר ע"פ אלגוריתם שנבנה – האלגוריתם ייבנה לענות על האילוצים שהוזכרו בתיאור הבעיה, האלגוריתם אמור להיות יעיל ככל האפשר ולפי הידע שיש לנו כעת בתחילת הפרויקט זמן הריצה אמור להיות בטווח של שעות עד ימים. ברגע שנבנה פריימר מתאים, יישלח מייל\התראה כלשהי למשתמש עם קישור לדף שיציג לו את

ברגע שנבנה פריימר מתאים, יישלח מיילוהתראה כלשהי למשתמש עם קישור לדף שיציג לו את הפריימר ואת הדוח שיופק ויסביר למשתמש באילו טווחים של האילוצים יוצר הפריימר הנייל.

לאחר יצירת הפריימר נבדוק האם קיימת אפשרות לבצע שמירה של הפריימר בDB כדי למנוע עבודה מיותרת של התוכנה ובזבוז זמן על חישובים חוזרים לגנים שכבר יוצר עבורם פריימר.

## תיאור הכלים המשמשים לפתרון

#### שפת התכנות בה נשתמש:

- אנו נשתמש בשפה JAVA SCRIPT לכתיבת התוכנה ואתר ה
- ננסה לעבוד עם  $\,\mathrm{DB}\,$  של אתר חיצוני, אך אם יהיה צורך לשמור פריימרים חדשים ולא  $\,\mathrm{DB}\,$  ננסה לעדכן את ה $\,\mathrm{DB}\,$  של האתר החיצוני נקים  $\,\mathrm{DB}\,$  שישתמש ככל הנראה בשפת

#### חומרה:

יש צורך לתחזק מחשב חזק – שרת שעליו ירוץ האלגוריתם ויבוצע עיבוד הנתונים, משום שדרושים חישובים רבים יש צורך במחשב בעל כוח עיבוד גדול.



## סקירת עבודות דומות בספרות והשוואה

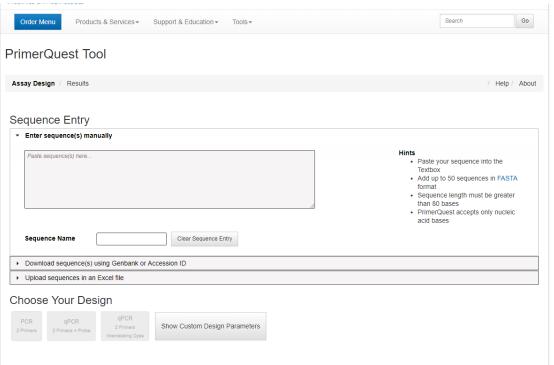
#### בפרק זה נבחן את המוצרים הדומים הקיימים כיום בשוק:

IDT - PrimerQuest Tool .1 אתר של חברת סינזטה המספק שירותים שונים הקשורים ל-DNA. אתר של חברת סינזטה המספק שירותים שונים הקשורים ל-DNA. האתר מציע ממשק לבניית פריימר לפי קבלת רצף או שם של גן ובניית פריימר בהתאם לטווחי האילוצים שקובע המשתמש בצורה ידנית. האתר מציג מספר של פריימרים (אפשר לקבוע את הכמות) ומציג פרטים לגבי הפריימרים: הפריימר עצמו (FORWARD,REVERSE) , אורך הפריימר , נקודת התחלה וסיום , אחוז קשרי . TM1 . GC

https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index : קישור

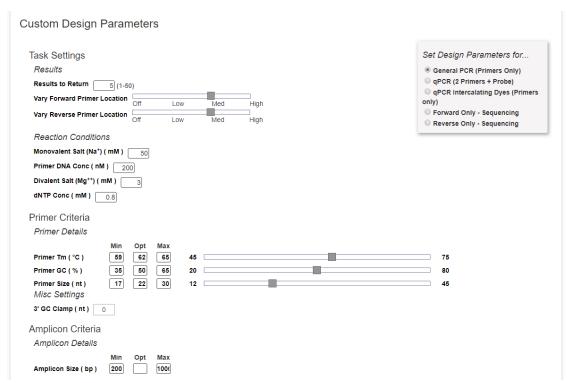
מסקנות: האתר מציע כביכול את השירות אותו אנו רוצים לתת, אך דורש מהמשתמש לבצע שינויים באילוצים בצורה ידנית ובכך יכול להיווצר מצב שלא ימצא פריימר מהסיבה שהוא אינו נמצא בטווחים שהכניס המשתמש למרות שקיים פריימר מתאים. בנוסף, אין התייחסות למוטציות הידועות של הגן, יכול להיות שנקבל פריימר שמכיל מוטציה ולכן לא יתאים לכלל האוכלוסייה.

השראה: ממשק משתמש נוח בעיקר בהצגת התוצאות, קבלת תוצאות מהירה (שניות).

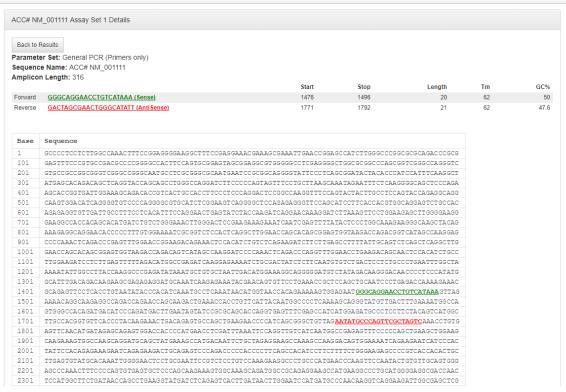


מסך חיפוש הגן לפי שם או רצף





מסך שינוי הפרמטרים לאילוצים



מסך תצוגת הפריימר שנמצא



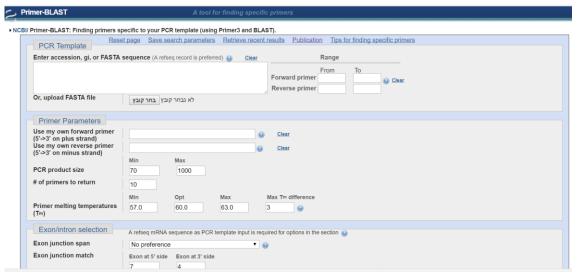
#### NCBI PRIMER-BLAST .2

אתר אתר הקשור למכונים הוא אתר NCBI – National Center for Biotechnology Information הלאומיים לבריאות של ארה"ב, הוא מספק מידע הכולל מאמרים בנושאים מחקריים ביורפואיים, ומחזיק מאגרי מידע נוספים הרלוונטיים למחקר בנושא הביוטכנולוגיה, וביניהם מידע על DNA.

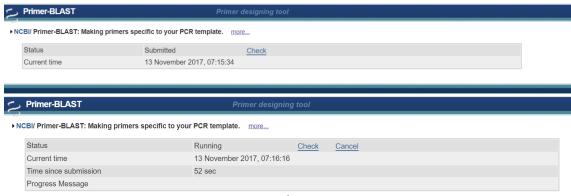
gene באתר קיים כלי שנקרא PRIMER BLAST – בכלי זה ניתן לבנות פריימר עייי הכנסת באתר קיים כלי שנקרא PRIMER BLAST והכנסת הפרמטרים הרצויים הקשורים לאילוצים כמו טמפי, אורך, אחוז קשרי ה sequence GC, האם הפריימר חייב להיות מורכב מחיבורים של exonיים או לא וכוי. לבסוף האתר מציג את הפריימר.

/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast : קישור:

השראה: באתר הזה ראינו שלאחר שהרצנו את החיפוש הרצוי, הופיע מסך שהציג את הזמן בו התחלנו את החיפוש והציג את סטטוס הפנייה ואיפה עומד התהליך.



מסך חיפוש הפריימר לפי שם או רצף ושינוי הפרמטרים



מסך עדכון תהליך יצירת הפריימר



	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCCGAGGAAACGAAAGCGAA	Plus	20	40	59	59.97	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	GGAGCTGCCCCTTGAGAAAT	Minus	20	396	377	60.03	55.00	5.00	2.00
Product length	357								
Products on intended	d target								
NM_001111.4 Homo s	apiens adenosine deaminase, RNA specific (ADA	R), transcript variant 1, mRNA							
roduct length = 357									
	CCGAGGAAACGAAAGCGAA 2059								
	GGAGCTGCCCCTTGAGAAAT 20								
empiace 350	277								
	lly unintended templates								
NM_015841.3 Homo :	sapiens adenosine deaminase, RNA specific (ADA	AR), transcript variant 3, mRNA							
roduct length = 357									
	CCGAGGAAACGAAAGCGAA 20 59								
	GGAGCTGCCCCTTGAGAAAT 20								
emplate 396	377								
NM_015840.3 Homo	sapiens adenosine deaminase, RNA specific (ADA	AR), transcript variant 2, mRNA							
	CCGAGGAAACGAAAGCGAA 20								
emplate 40 .	59								
	GGAGCTGCCCCTTGAGAAAT 20								
emplace 550									
XM_006711111.3 PRE	EDICTED: Homo sapiens adenosine deaminase, F	RNA-specific (ADAR), transcript varia	nt X5, mRNA						
roduct length = 357									
orward primer 1	TCCGAGGAAACGAAAGCGAA 20								
	123								
leverse primer 1	GGAGCTGCCCTTGAGAAAT 20								

## : ישנן עוד מספר אפליקציות רשת העובדות בצורה זהה

- http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\_www.cgi
- http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
  - http://bisearch.enzim.hu/?m=search

כולם עובדים בצורה זהה של הכנסת רצץ/שם הגן , וקביעת פרמטרים. אף אחד מהכלים לא מציע מציאת פריימר ללא התערבות בפרמטרים ובהתחשבות במוטציות.



## נספחים

ספרות, תרשימים נוספים, תכנון הפרויקט, טבלת ניהול סיכונים, טבלת דרישות (URD),

## רשימת ספרות \ ביבליוגרפיה

## תכנון הפרויקט

פגישה ראשונה עם דר׳ חסין לקבלת הפרוייקט	.24.10
הגשת טופס הצעה לאחר אישור המנחה	19.11
סיום מחקר ספרותי	1.12
קוד ראשוני לאלגוריתם , תחילת בדיקות הרצה	20.12
התחלת בניית ממשק משתמש	1.1
הצגת אב טיפוס (אלגוריתם חלקי)	21.1
סיום כתיבת האלגוריתם , תחילת בדיקות	1.3
סיום בדיקות עצמאיות , הפצת גרסת בטא	1.4
קבלת משובים	1.5
סיום תיקונים	20.5
הגשת הפרוייקט	22.6



# טבלת סיכונים

מענה אפשרי	סבירות	חומרה	הסיכון	#
ביצוע סקר שוק מקיף לשלילת מוצרים זהים	2	1	תוכנות מתחרות – תוכנות המציעות את אותו השירות בדיוק.	1
נתמקד בהיבטים התוכניתיים ולא הביולוגים של הבעיה ופתרונה. למשל הסתכלות על DNA כסטרינג.	3	1	חוסר ידע בתחום הביולוגי – לפרוייקט הקשרים לתחום הביולוגיה ואנו חסרי ידע מקדים בנושא	2
ננסה להסתמך על יותר ממקור אחד.	1	3	עבודה עם מסדי נתונים קיימים – עלולות להית קריסות במסד נתונים שלא תלוי בנו	3
ננסה לכתוב את האלגוריתם בדיקה היעיל ביותר. כמו כן נאמר לנו שהאלגוריתם אמור לרוץ בטווח של שעות עד ימים – טווח ארוך מספיק.	2	3	ביצועים - לתוכנה יקח זמן רב מידי להפיק את המידע הרצוי	4
נפנה לחוקר לצורך חידודים באילוצים, כמו כן נוודה שהאלגוריתם מוצא פריימר על גן שידוע שקיים פריימר עבורו	1	2	אילוצים רבים מידי – לא נצליח למצוא פריימר התואם לכל האילוצים	5
תכנון זמנים יעיל. קביעת ימי עבודה קבועים.	2	2	עמידה בזמנים – לא נספיק לבנות את התוכנה במועד	6
ניעזר בגורמים חיצוניים במידת הצורך.	2	2	מכושלים תכנותיים – חוסר הצלחה בכתיבת האלגוריתם	7
				8



# טבלת דרישות

# (User Requirement Document) טבלת דרישות

תיאור	דרישה
הפריימרים שיתקבלו מהתוכנה יהיו נכונים ואמינים	נכונות
בהתאם לאילוצים	
מציאת הפריימר תהיה אוטומטית ללא התערבות אדם	מערכת אוטומטית
בפרמטרים	
התוצאה תתקבל בזמן סביר (כרגע לפי הערכה מסי שעות)	זמנים
המערכת תהיה זמינה לציבור הרחב (אתר אינטרנט ציבורי)	גלובלי
האתר יתמוך במספר בלתי מוגבל של בקשות אך ייתכן	מס משתמשים
שמספר רב של בקשות ירום לעיכובים בתוצאות	
הממשק יהיה פשוט למשתמש מהתחום, יציג את הנתונים	קלות שימוש
בצורה הברורה ביותר	