

**Biotecnologia e
Suas Aplicações
na Genética e
Melhoramento
de Plantas**



Sequenciamento de RNA e Expressão Diferencial

Cristiane Taniguti

Fernando Correr

Letícia Lara

Marianella Quezada

Sumário

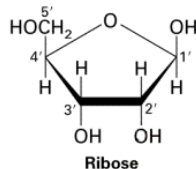
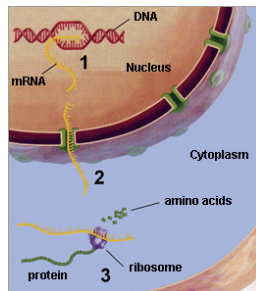
- 1 RNA
- 2 Transcriptoma
- 3 Sequenciamento de RNA
- 4 Extração do RNA
- 5 Construção da Biblioteca
- 6 Expressão Diferencial
- 7 Bibliografia

RNA

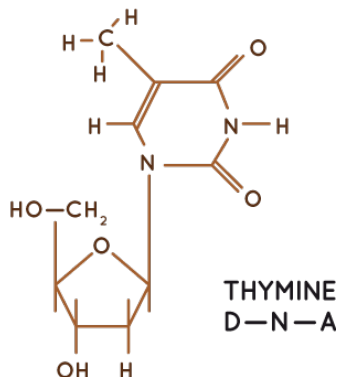
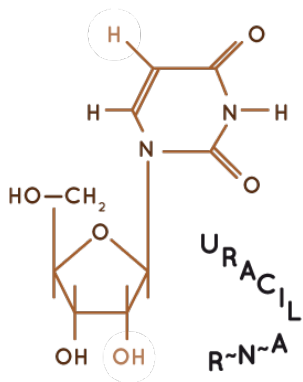
O que é o RNA?

Definição Geral

- Cadeia Unifilamentar de nucleotídeos
- Ribose: Hidroxila no carbono 2'
- Uracil



O que é o RNA?



Fonte: [RNA History](#)

RNA

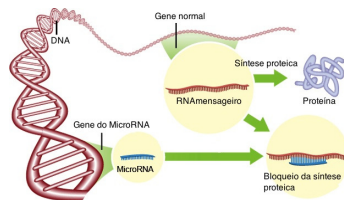
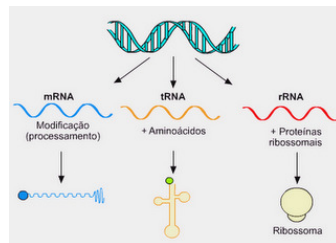
Classes de RNA

Codificadores

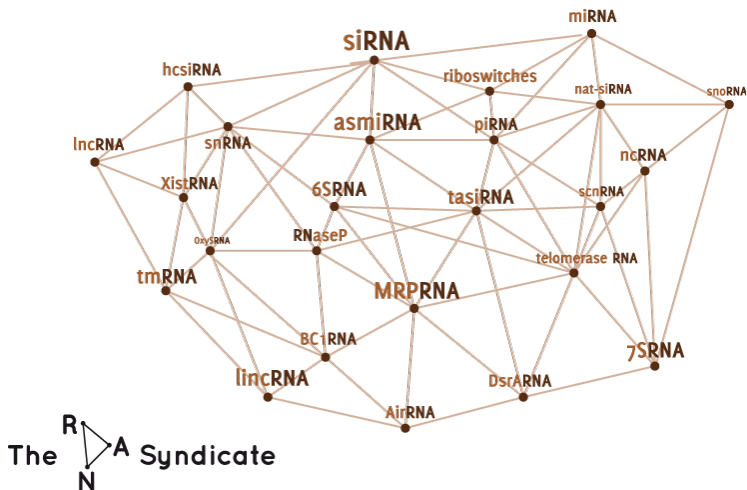
- mRNA: Intermediários

Não codificadores

- tRNA
- rRNA
- snRNA
- microRNA
- siRNA



Classes de RNA



Fonte: [RNA History](#)

Transcriptoma

Considerando um estágio específico de desenvolvimento ou uma determinada condição fisiológica, o transcriptoma representa o conjunto dos transcritos de uma célula, quais são e quantos são.

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos
- Compreensão de estresses

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos
- Compreensão de estresses

Objetivos

Catálogo;

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos
- Compreensão de estresses

Objetivos

Catálogo;
Estrutura;

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos
- Compreensão de estresses

Objetivos

Catálogo;
Estrutura;
Isoformas;

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos
- Compreensão de estresses

Objetivos

Catálogo;

Estrutura;

Isoformas;

Modificações pós-transcricionais;

Transcriptoma

- Elementos funcionais do Genoma
- Constituintes de células e tecidos
- Compreensão de estresses

Objetivos

Catálogo;

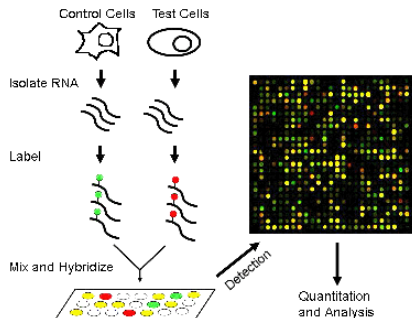
Estrutura;

Isoformas;

Modificações pós-transcricionais;

Mudanças nos níveis de expressão;

Transcriptoma -Tecnologias



Técnicas de Hibridização:
cDNAs marcados fluorescendentemente e dependência da sequência genômica.

Transcriptoma - Tecnologias

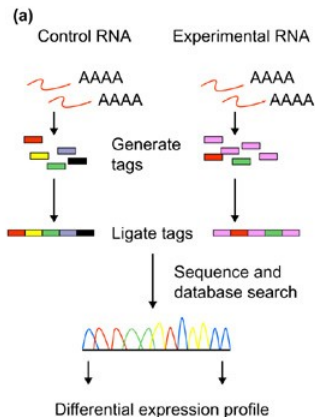
A abordagem baseada em sequência utiliza-se diretamente do cDNA

Table 1 | **Advantages of RNA-Seq compared with other transcriptomics methods**

Technology	Tiling microarray	cDNA or EST sequencing
<i>Technology specifications</i>		
Principle	Hybridization	Sanger sequencing
Resolution	From several to 100 bp	Single base
Throughput	High	Low
Reliance on genomic sequence	Yes	No
Background noise	High	Low
<i>Application</i>		
Simultaneously map transcribed regions and gene expression	Yes	Limited for gene expression
Dynamic range to quantify gene expression level	Up to a few-hundredfold	Not practical
Ability to distinguish different isoforms	Limited	Yes
Ability to distinguish allelic expression	Limited	Yes
<i>Practical issues</i>		
Required amount of RNA	High	High
Cost for mapping transcriptomes of large genomes	High	High

Transcriptoma - Tecnologias

Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)



Sequenciamento de RNA



RNA-Seq

As novas plataformas de alto rendimento de DNA permitem uma nova metodologia para mapear e quantificar o transcriptoma.

Sequenciamento de RNA

Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

Sequenciamento de RNA

Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

- Sequências curtas *single-end* ou *paired-end*;

Sequenciamento de RNA

Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

- Sequências curtas *single-end* ou *paired-end*;
- Tamanho de 30pb a 400pb;

Sequenciamento de RNA

Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

- Sequências curtas *single-end* ou *paired-end*;
- Tamanho de 30pb a 400pb;

Para os objetivos principais:

Sequenciamento de RNA

Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

- Sequências curtas *single-end* ou *paired-end*;
- Tamanho de 30pb a 400pb;

Para os objetivos principais:

- Alinhamento com um genoma de referência ou montagem *de novo*;

Sequenciamento de RNA

Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

- Sequências curtas *single-end* ou *paired-end*;
- Tamanho de 30pb a 400pb;

Para os objetivos principais:

- Alinhamento com um genoma de referência ou montagem *de novo*;
- Compreensão dos limites dos transcritos;

Sequenciamento de RNA

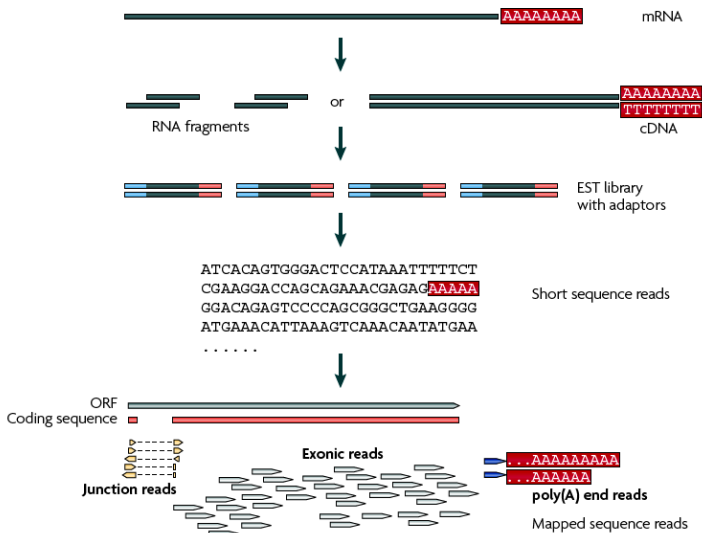
Utiliza-se de um método de alto rendimento para obter:

- Sequências curtas *single-end* ou *paired-end*;
- Tamanho de 30pb a 400pb;

Para os objetivos principais:

- Alinhamento com um genoma de referência ou montagem *de novo*;
- Compreensão dos limites dos transcritos;
- Níveis de Expressão;

Sequenciamento de RNA



Extração do RNA

Os principais protocolos para a extração do RNA são:

- TRIzol

Extração do RNA

Os principais protocolos para a extração do RNA são:

- TRIzol
- Cloreto de Lítio

Extração do RNA

Os principais protocolos para a extração do RNA são:

- TRIzol
- Cloreto de Lítio
- Kits

Ex: RNeasy

Depleção do RNA Ribossomal

A classe majoritária dos RNAs de uma célula é a do rRNA. Há duas maneiras para que eles não sejam utilizados nas análises:

- Depleção do rRNA

Depleção do RNA Ribossomal

A classe majoritária dos RNAs de uma célula é a do rRNA. Há duas maneiras para que eles não sejam utilizados nas análises:

- Depleção do rRNA
- Enriquecimento do mRNA

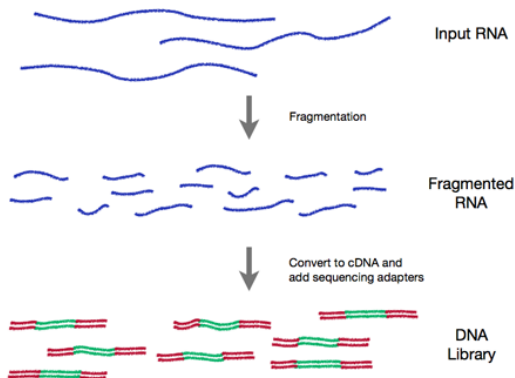
Fragmentação do RNA e síntese do cDNA

A fragmentação primária do RNA pode ser feita pela ação da RNase III ou pela hidrólise induzida por zinco (Illumina).

- Protocolo dUTP
- TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit

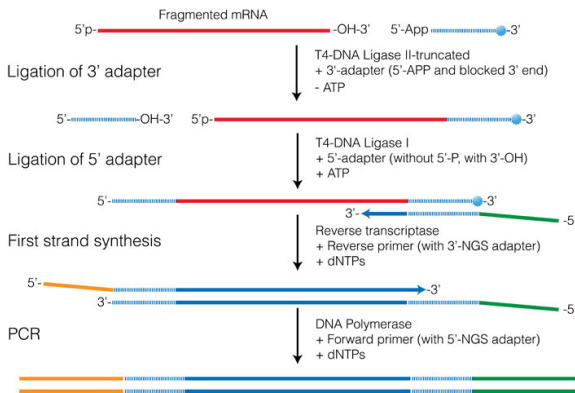
Hibridização com primers aleatórios

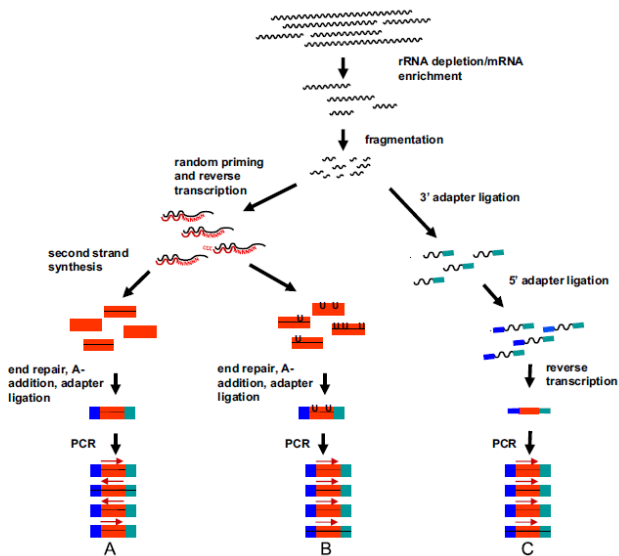
Uso de primers aleatórios para o início da síntese do cDNA. Porém, essa maneira induz a viés.

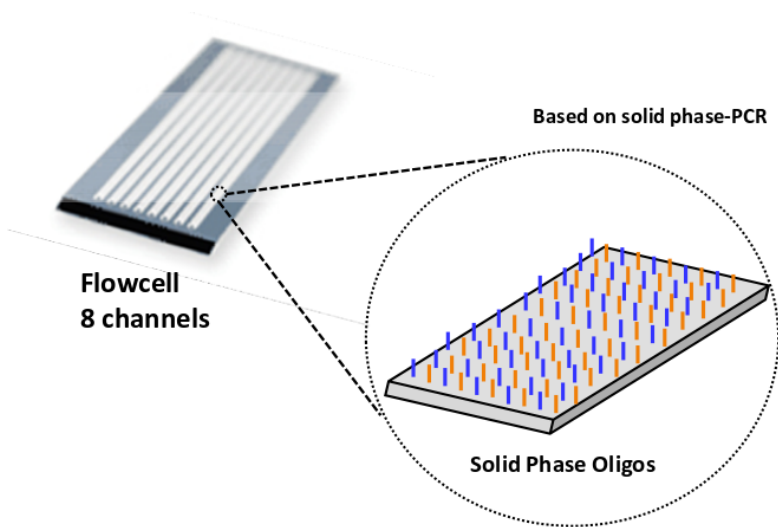


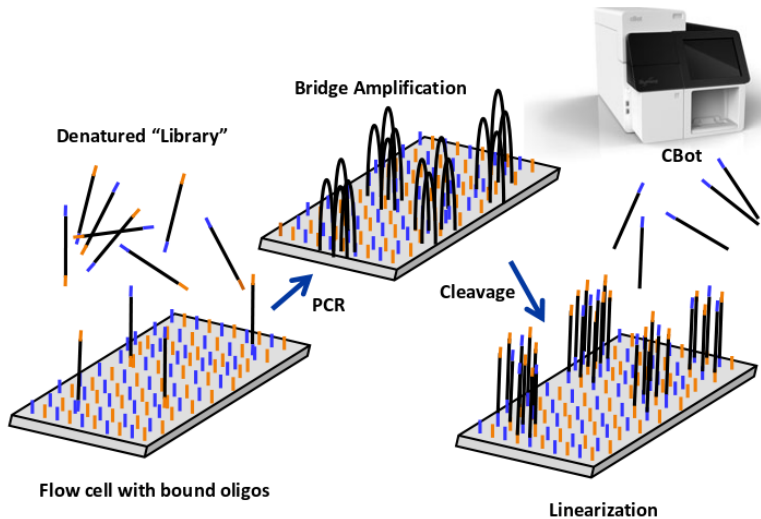
Ligação dos adaptadores

Adaptadores 3' (Rnl2) e 5' (Rnl1). Posteriormente, ocorre a transcrição reversa, quando não se utiliza o cDNA.



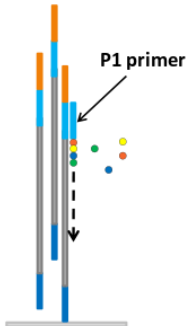








HiSeq 2000

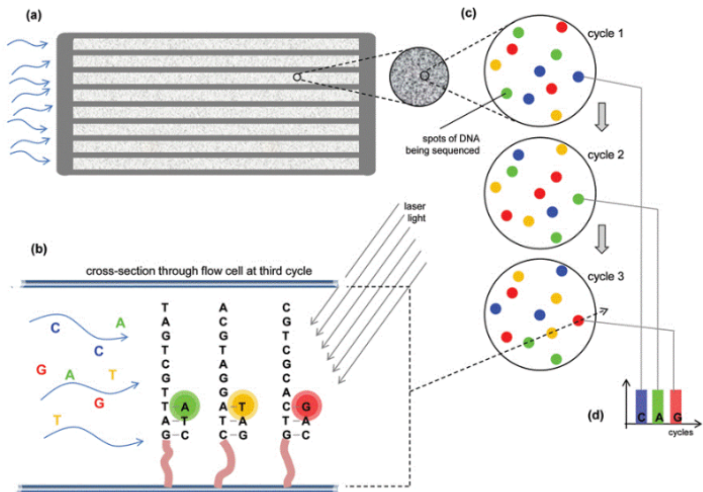


Sequencing by Synthesis

TGCA

Flowcell





Desafios da Bioinformática

Desafios da Informática:

- Armazenar
- Recuperar
- Processar

Compreender:

- Alinhamento de leituras em locais múltiplos
- Junções éxon-éxon

Expressão Diferencial

O RNA-Seq é quantitativo, pois são geradas leituras mapeáveis ao genoma.

Há grande acurácia, permitindo resultados comparáveis. É vantajoso capturar a dinâmica do transcriptoma entre diferentes condições.

Expressão Diferencial

O RNA-Seq é quantitativo, pois são geradas leituras mapeáveis ao genoma.

Há grande acurácia, permitindo resultados comparáveis. É vantajoso capturar a dinâmica do transcriptoma entre diferentes condições.

- Diferentes Tecidos

Expressão Diferencial

O RNA-Seq é quantitativo, pois são geradas leituras mapeáveis ao genoma.

Há grande acurácia, permitindo resultados comparáveis. É vantajoso capturar a dinâmica do transcriptoma entre diferentes condições.

- Diferentes Tecidos
- Desenvolvimento

Expressão Diferencial

O RNA-Seq é quantitativo, pois são geradas leituras mapeáveis ao genoma.

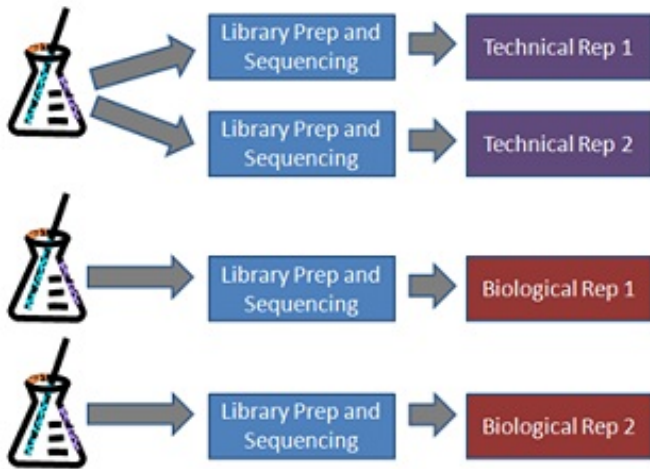
Há grande acurácia, permitindo resultados comparáveis. É vantajoso capturar a dinâmica do transcriptoma entre diferentes condições.

- Diferentes Tecidos
- Desenvolvimento
- Estresses

Expressão Diferencial



Réplica técnica e réplica biológica





Zhong Wang & Mark Gerstein & Michael Snyder (2009)

RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics

Nature Reviews Genetics 10(1), 57 – 63.



Erwin van Dijk & Yan Jaszczyszyn & Claude Thermes(2014)

Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias

Experimental Cell Research 322, 12 – 20.

Obrigado!!!

Vamos para a **prática!**