



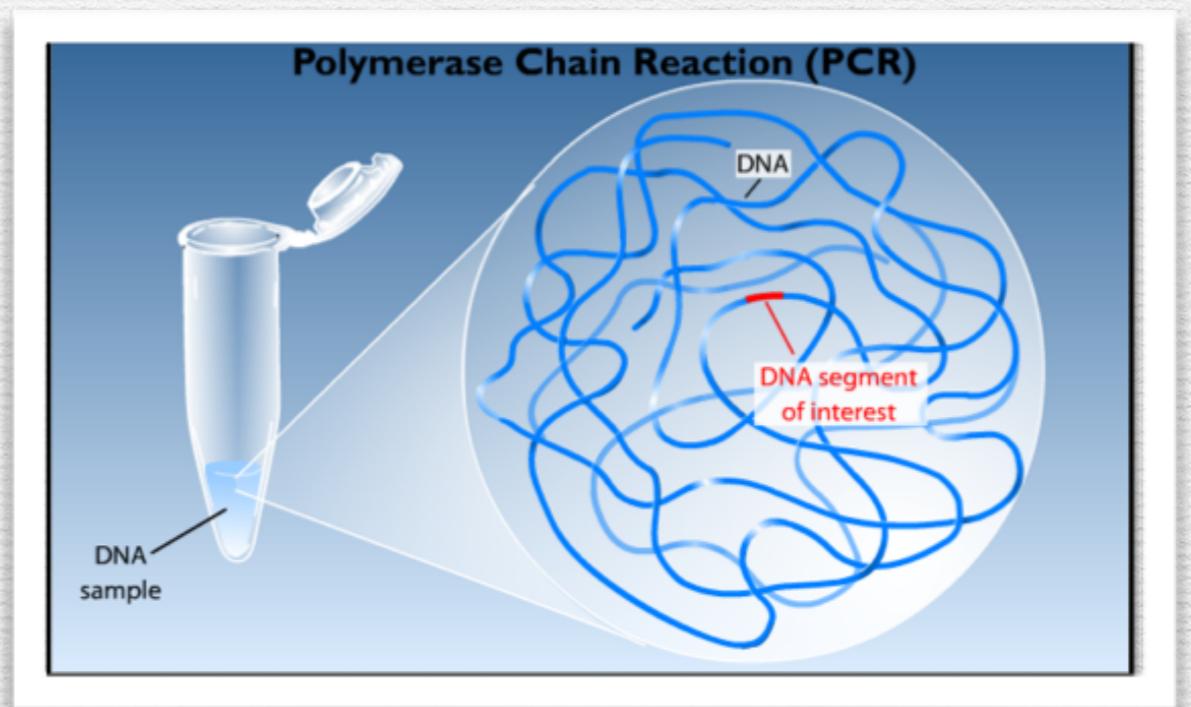
Princípios de metodologias básicas em Genética

Prof^a Dr^a Sintia Iole N. Belangero

Curso de Introdução à Bioinformática Aplicada à Genética

PCR convencional

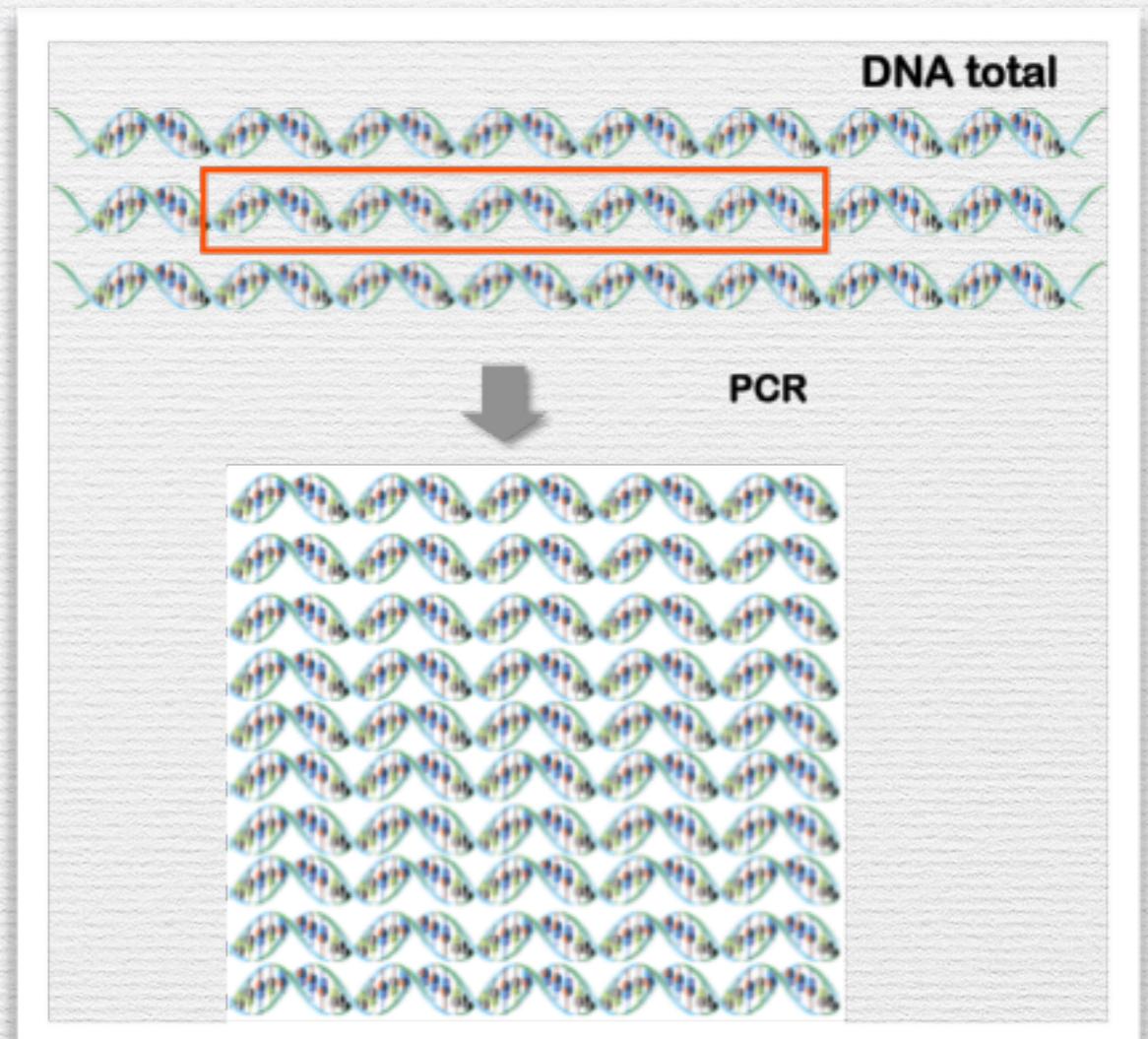
Descrita pela primeira vez por Kari Mullis em 1983.



PCR convencional

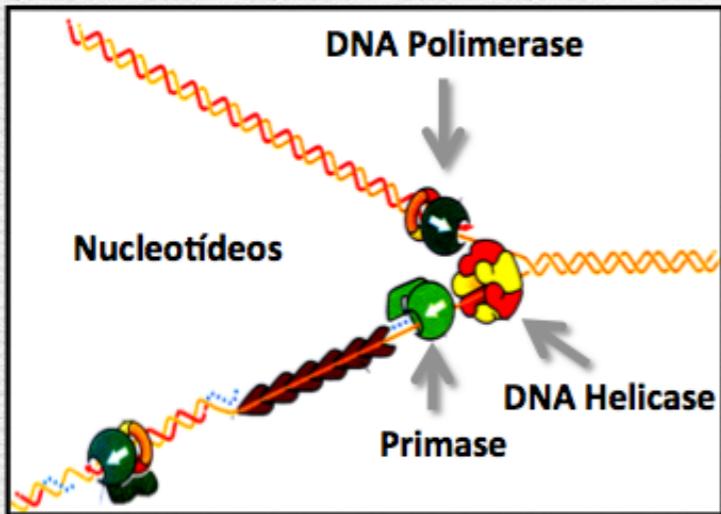
Aplicações

- Medicina forense
- Diagnóstico clínico
- Detecção de patógenos
- Marcadores moleculares
- Expressão gênica
- Seleção de clones recombinantes
- Sequenciamento direto de produtos de PCR
- Estudos evolutivos



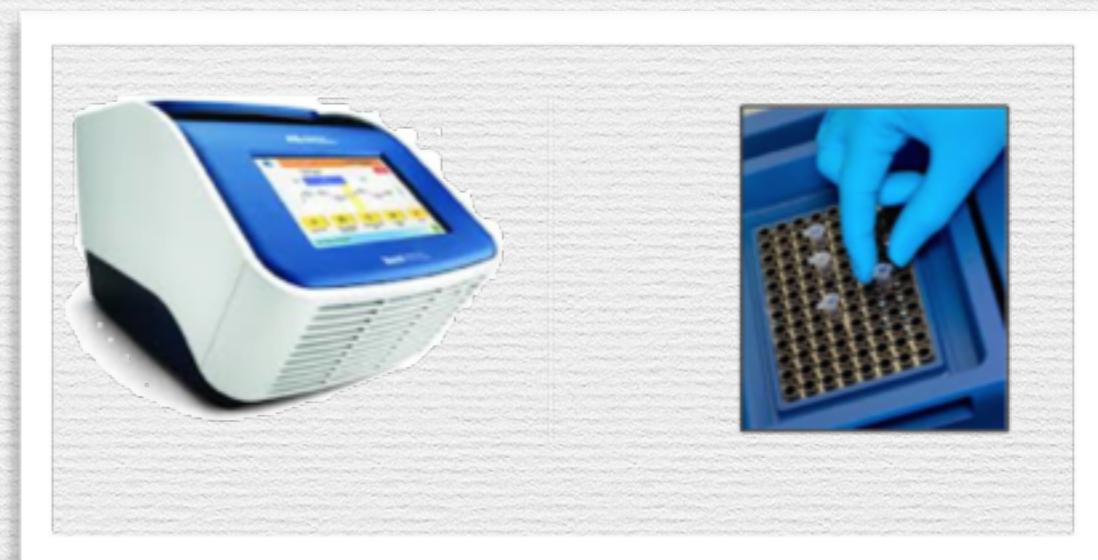
PCR convencional

In vivo



In vitro

- DNA
- dNTPs (nucleotídeos)
- Primers sintéticos
- DNA polimerase especial
- Água
- Tampão
- Mg²
- Temperatura



PCR convencional

Princípios:

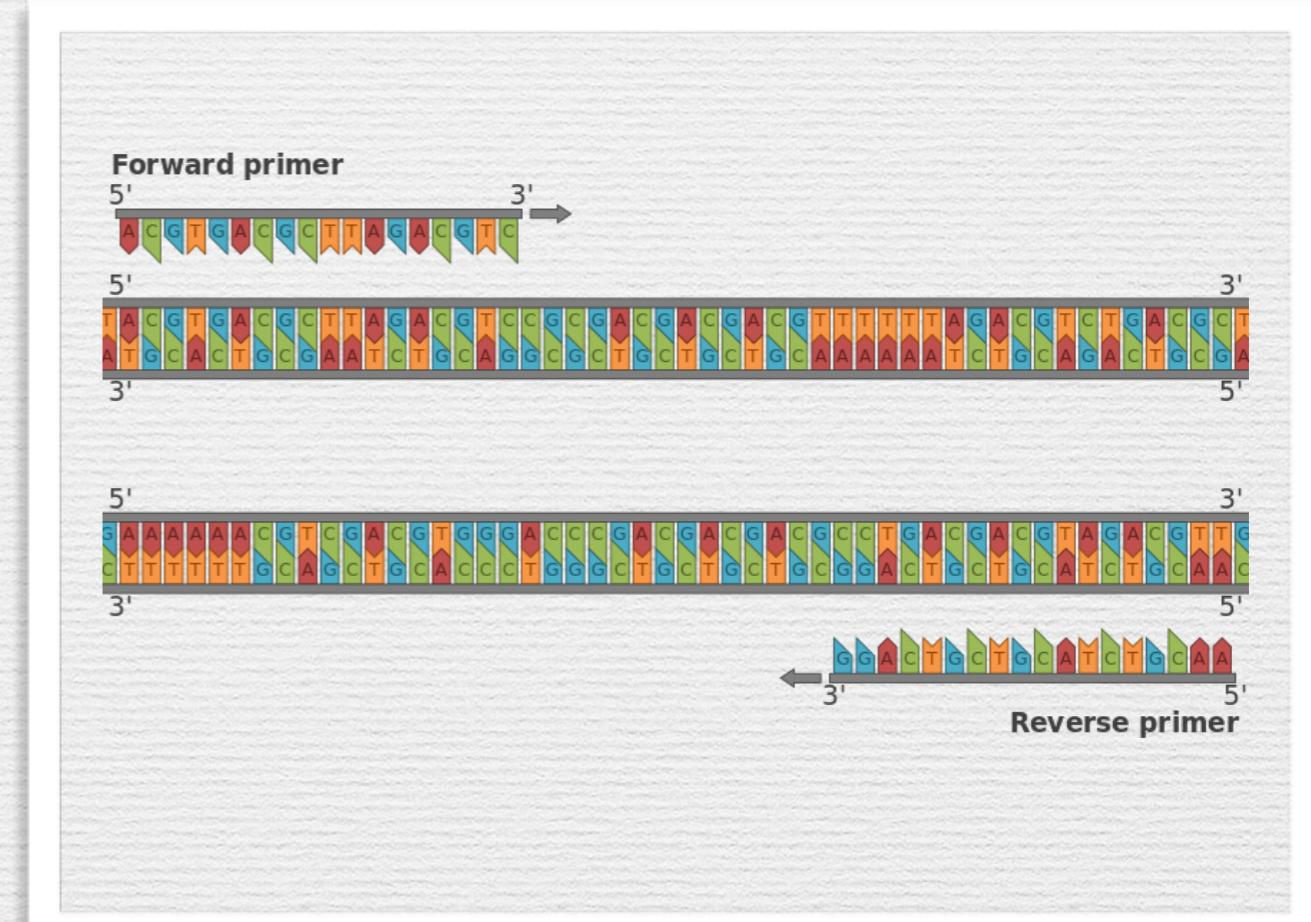
- Taq Polimerase
- Enzima da bactéria *Thermus aquaticus*



PCR convencional

- Primers são específicos

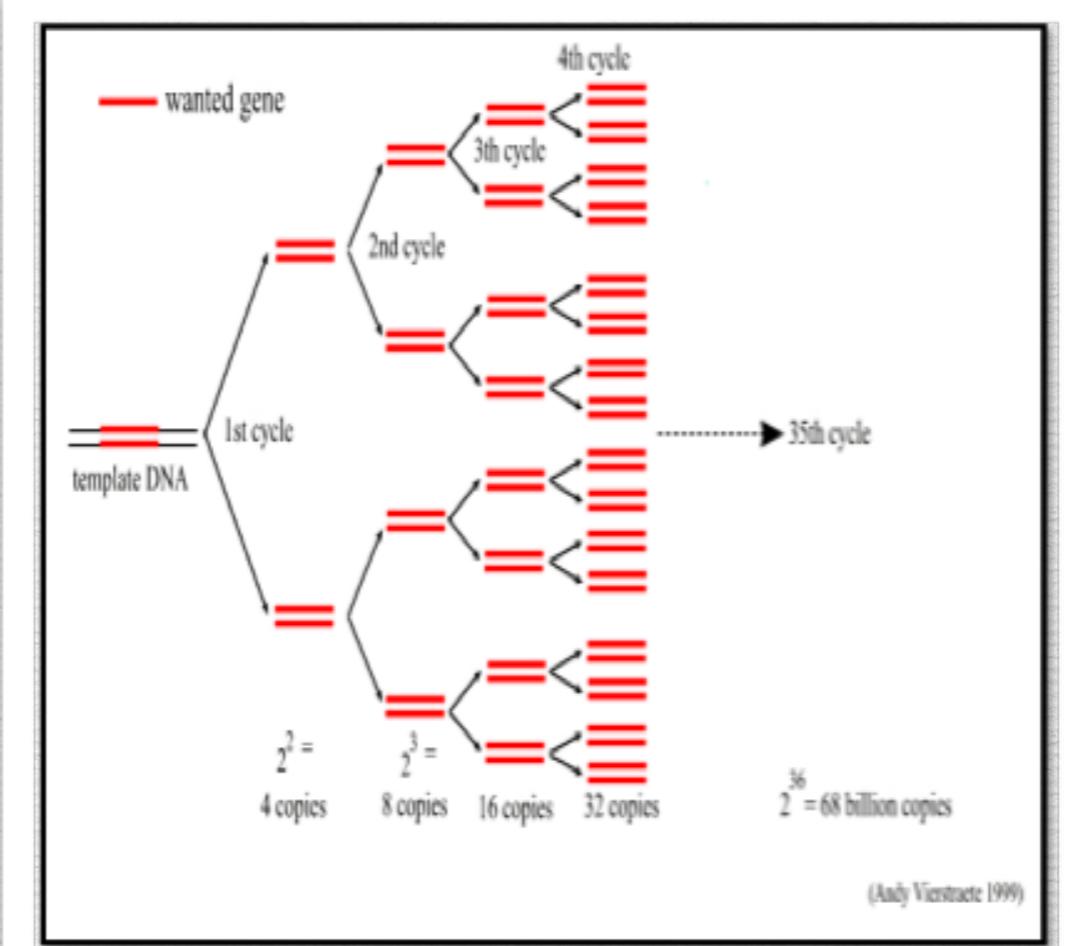
- 1 nucleotídeo = 1/4
 - 2 nucleotídeos = 1/16
 - 3 nucleotídeos = 1/64
 - 4 nucleotídeos = 1/256
 - 20 nucleotídeos = 1/1.099.511.627.776



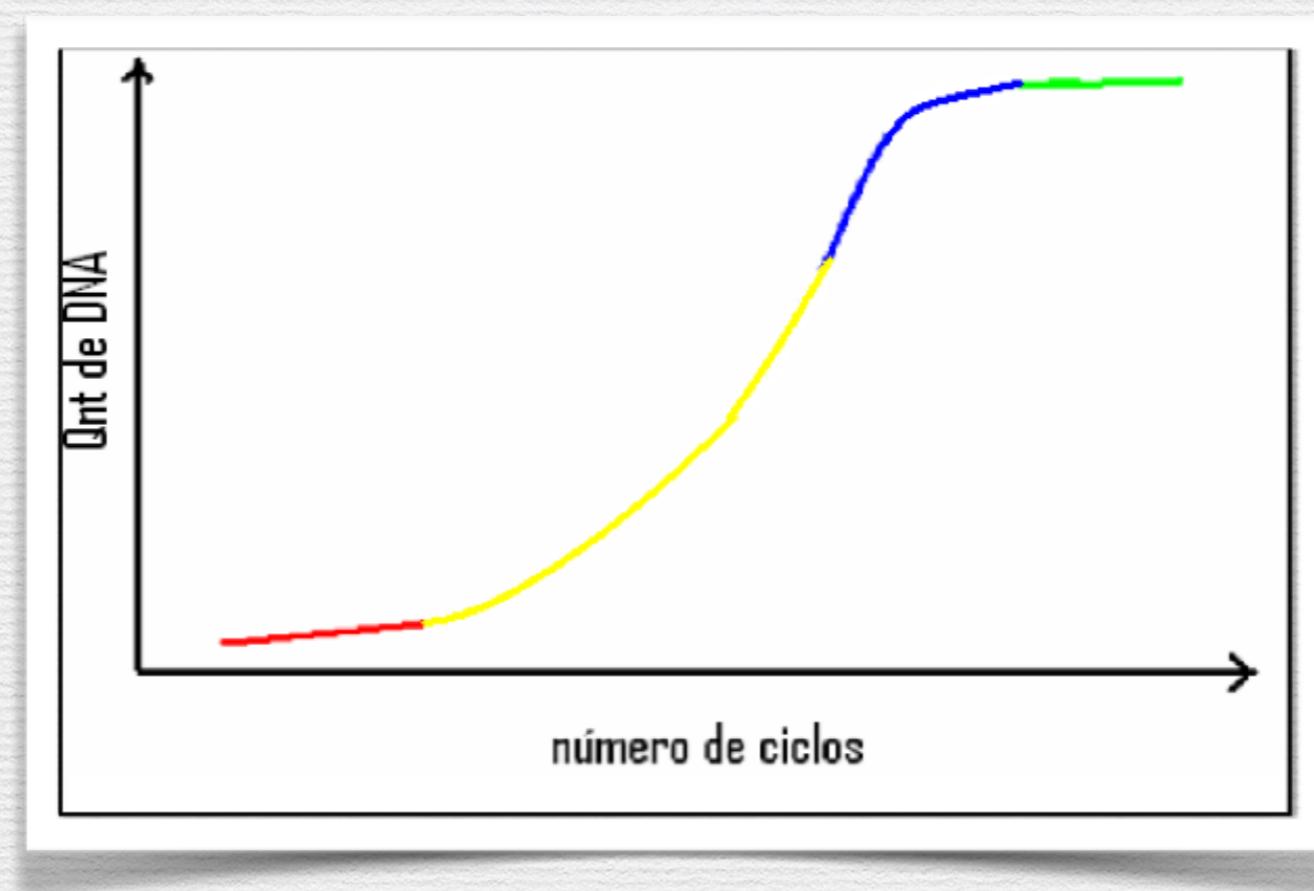
PCR convencional

- Amplificação exponencial

Nº Ciclos	Nº amplicons
1	2
2	4
3	8
4	16
20	1.048.576
30	1.073.741.824



PCR convencional



Inicial
Exponencial
Linear
Platô

PCR convencional

Modelo hipotético:

Seqüência nucleotídica do gene da proteína receptora de "LDL"

5' AATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACTGGGAAGGCCAGGATGGAGCCACCGATCCAGACGGAGTACTTCCTCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGCTATGCCTCGA3'
3' TTAGGTGTAGACGACCTTCCACCTGACCCTTCGGTCCCTACCTCGGTGGCTAGGTCTGCCTCATGAAGGAGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACGATAACGCGAAGCT5'
5' AATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACTGGGAAGGCCAGGAT~~GGAGCCACCGATCCAGACGGAGTACTTC~~CTCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGCTATGCCTCGA3'
3' TTAGGTGTAGACGACCTTCCACCTGACCCTTCGGTCC~~TA~~~~CCTCGGTGGCTAGGTCTGCCTCATGAAG~~GAGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACGATAACGCGAAGCT5'

Projetando os "primers"...

Deleção relacionada com acúmulo de colesterol nos vasos sanguíneos

5' AATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACTGGGAAGGCCAGGAT~~GGAGCCACCGATCCAGACGGAGTACTTC~~CTCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGCTATGCCTCGA3'
3' TTAGGTGTAGACGACCTTCCACCTGACCCTTCGGTCC~~TA~~~~CCTCGGTGGCTAGGTCTGCCTCATGAAG~~GAGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACGATAACGCGAAGCT5'



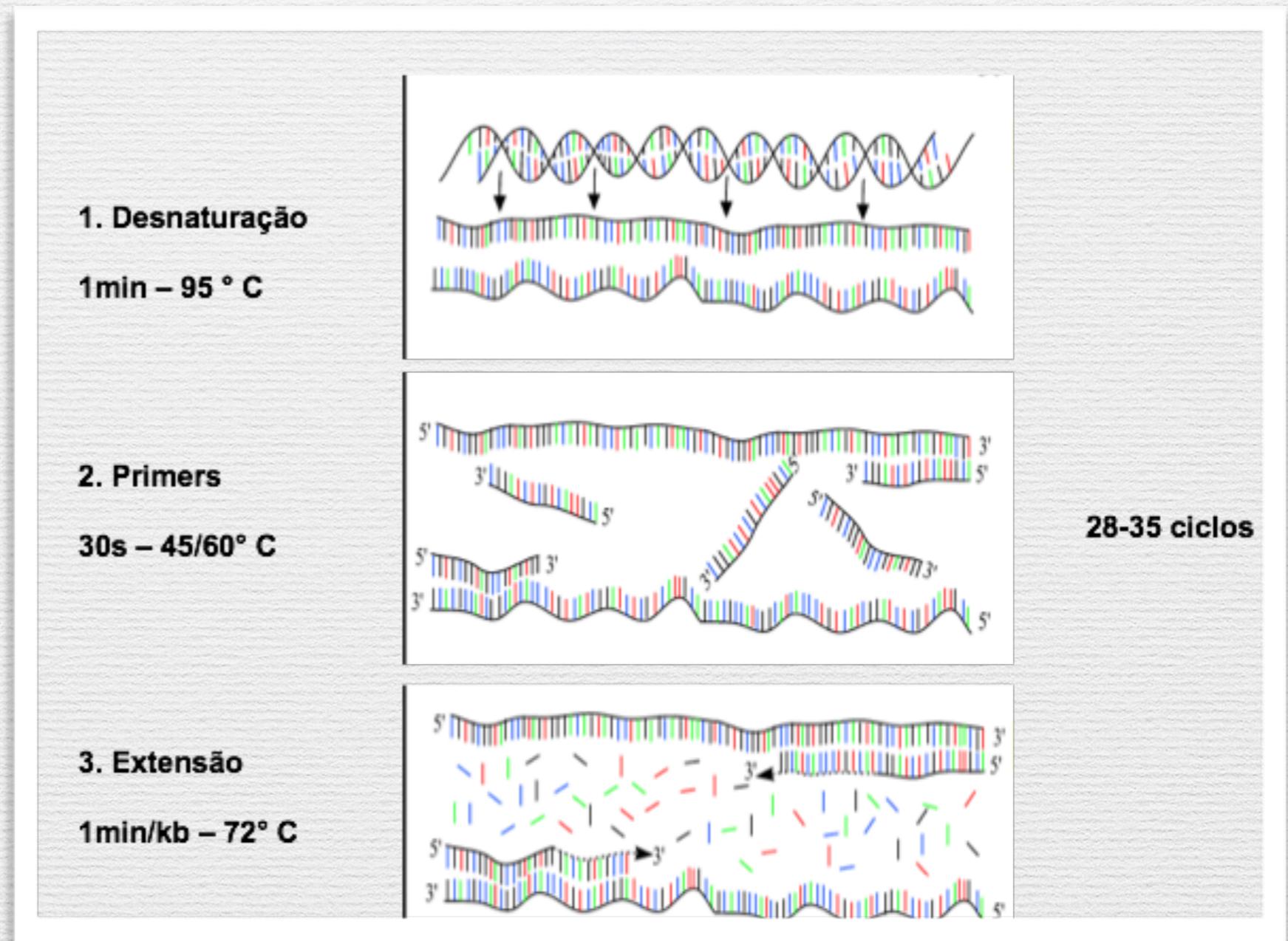
5' CTGGAAAGGTGGACTGGGA3'



3' CTAGAACGATAACGCGA5'

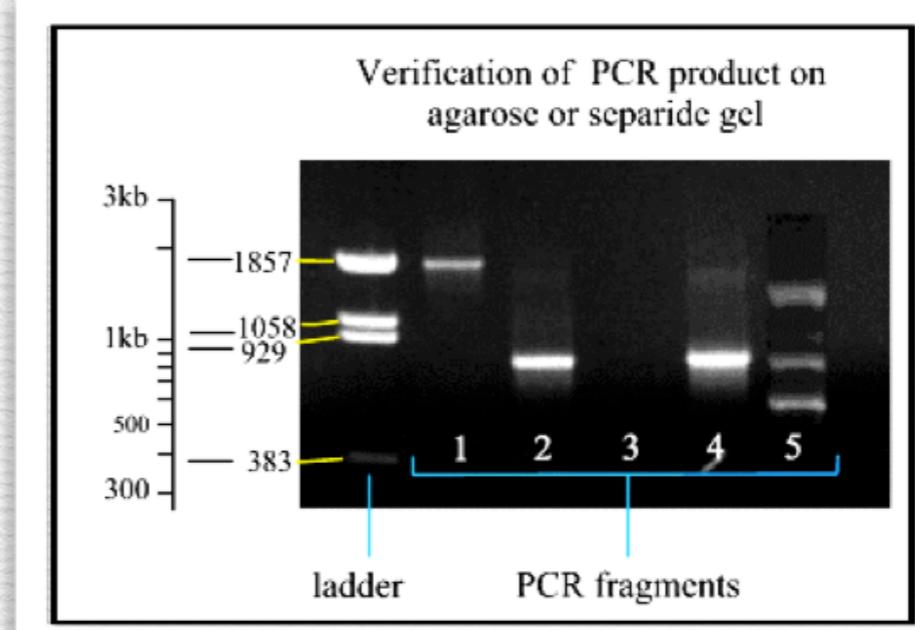
PCR convencional

- Condições



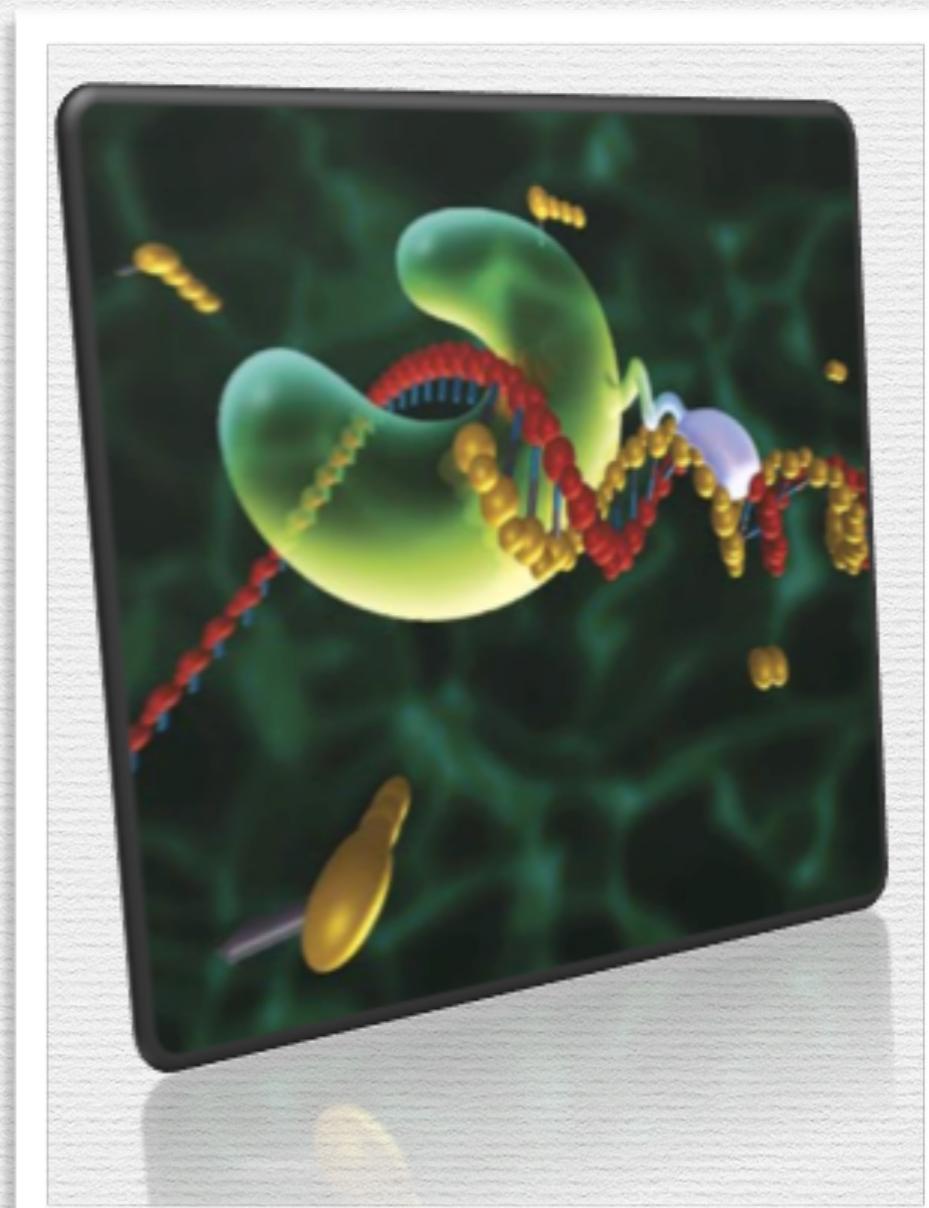
PCR convencional

- Detecção do produto



PCR em tempo real

Descrita por Higuchi et al., 1992.



PCR tempo real

- Princípio: similar à PCR convencional
- Diferença
 - sistema de detecção
 - detecção é feita em tempo real
 - pelo software acoplado ao equipamento
- Quantitativa



PCR tempo real

Aplicações

- Genotipagem
- Mutação
- Detecção de patógenos
- Carga viral
- Validação de experimentos
- Expressão Gênica
- Transgênico
- miRNA
- siRNA
- Detecção de número de cópias (CNVs)

PCR em tempo real

Qualitativo

Quantitativo

Genotipagem, Detecção
de Patógeno etc.

Quantificação
relativa

Quantificação
absoluta

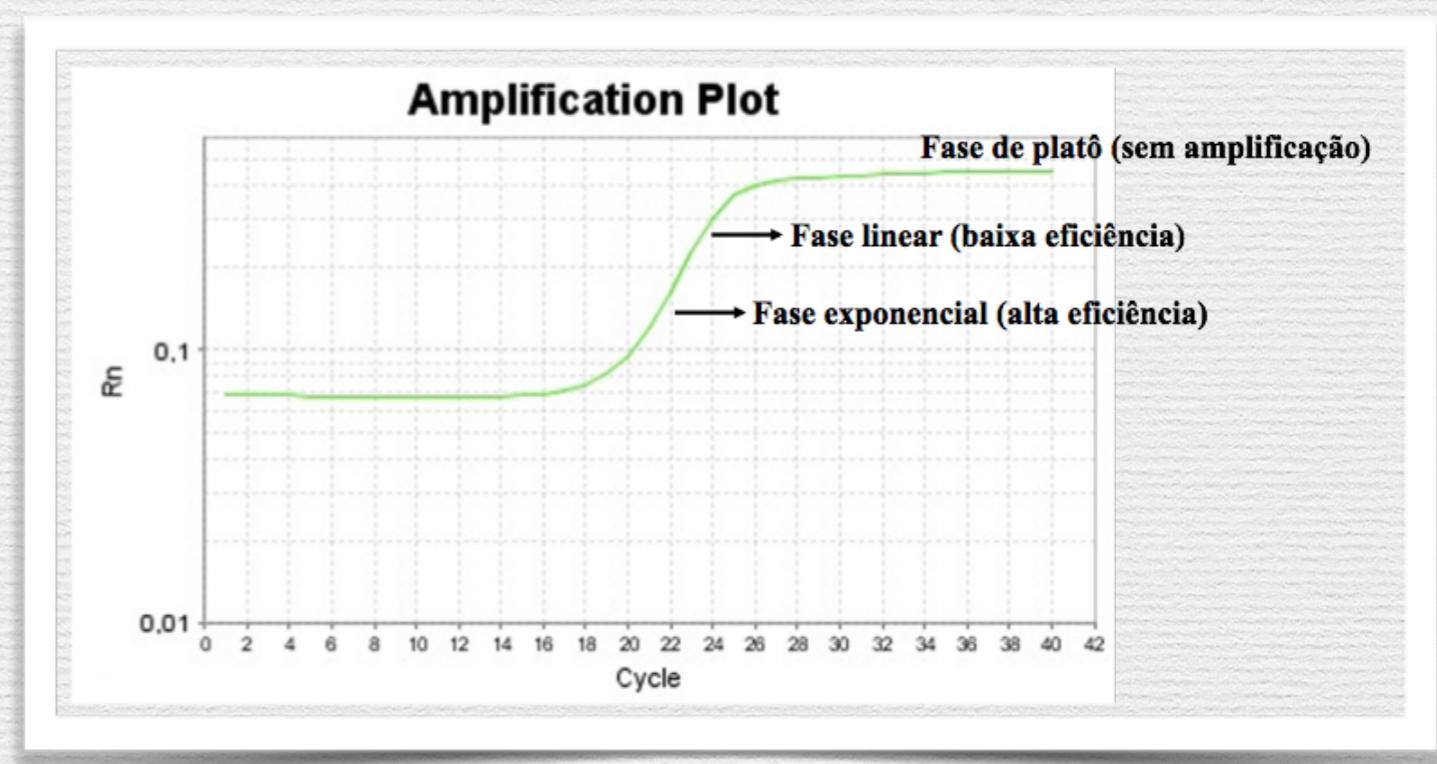
Método da Curva
Padrão Relativa

Método do Ct
comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

Método da Curva
Padrão

PCR tempo real

Etapas de amplificação



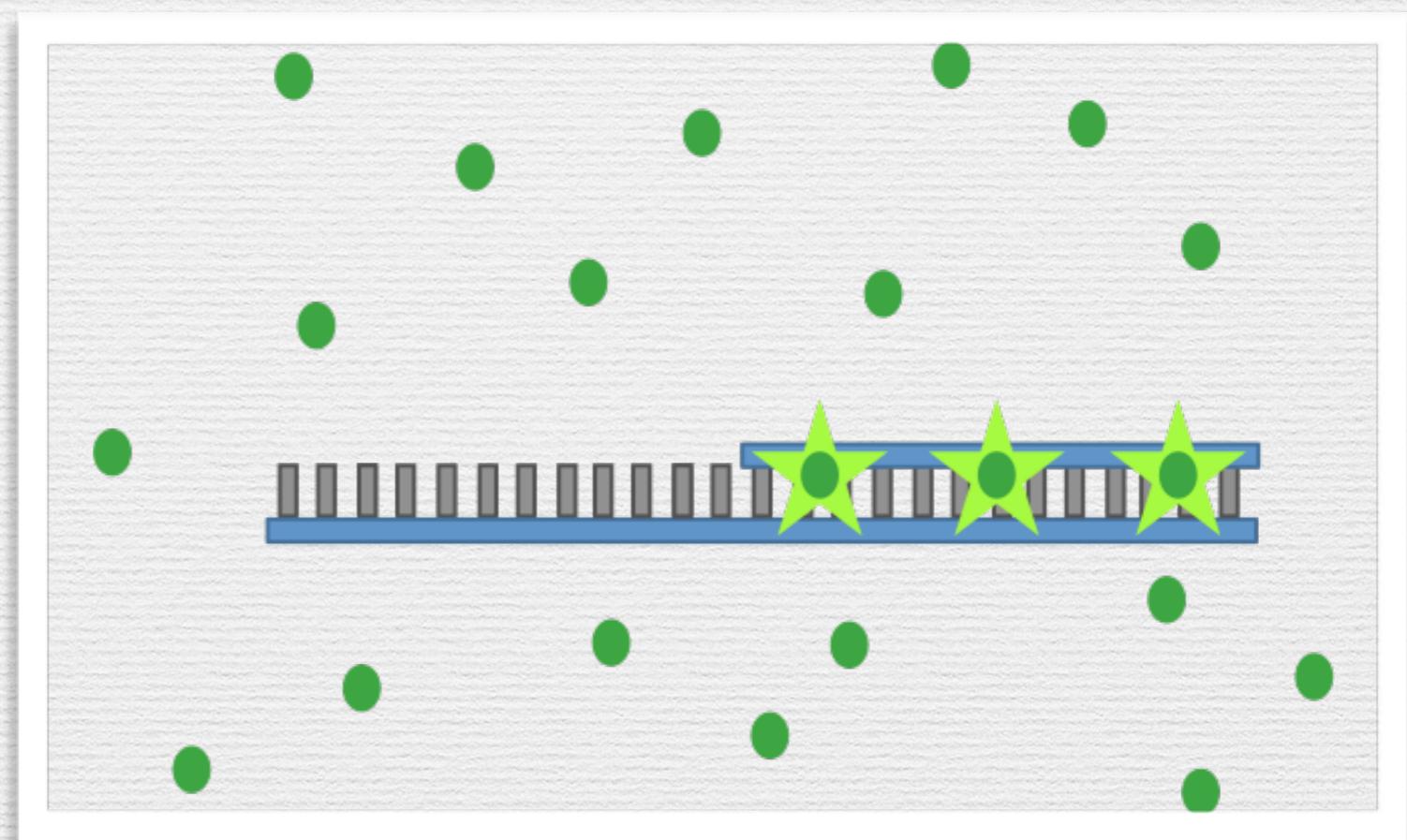
PCR tempo real

Sistema de detecção

- Intercalantes
- Sonda e primers

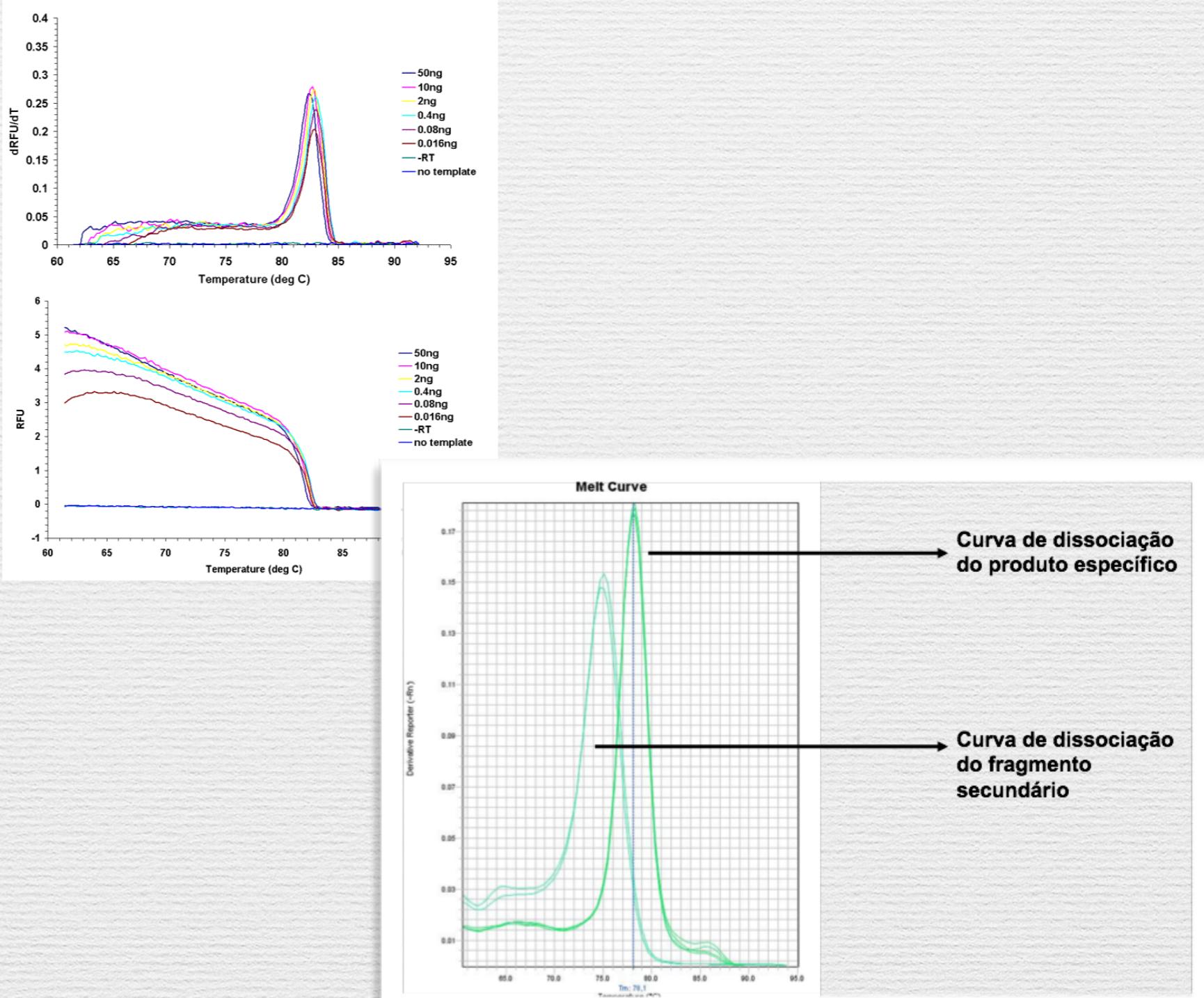
PCR tempo real

Intercalantes



PCR tempo real

Necessário fazer
curva de *Melting*



PCR tempo real

Intercalantes

Vantagens

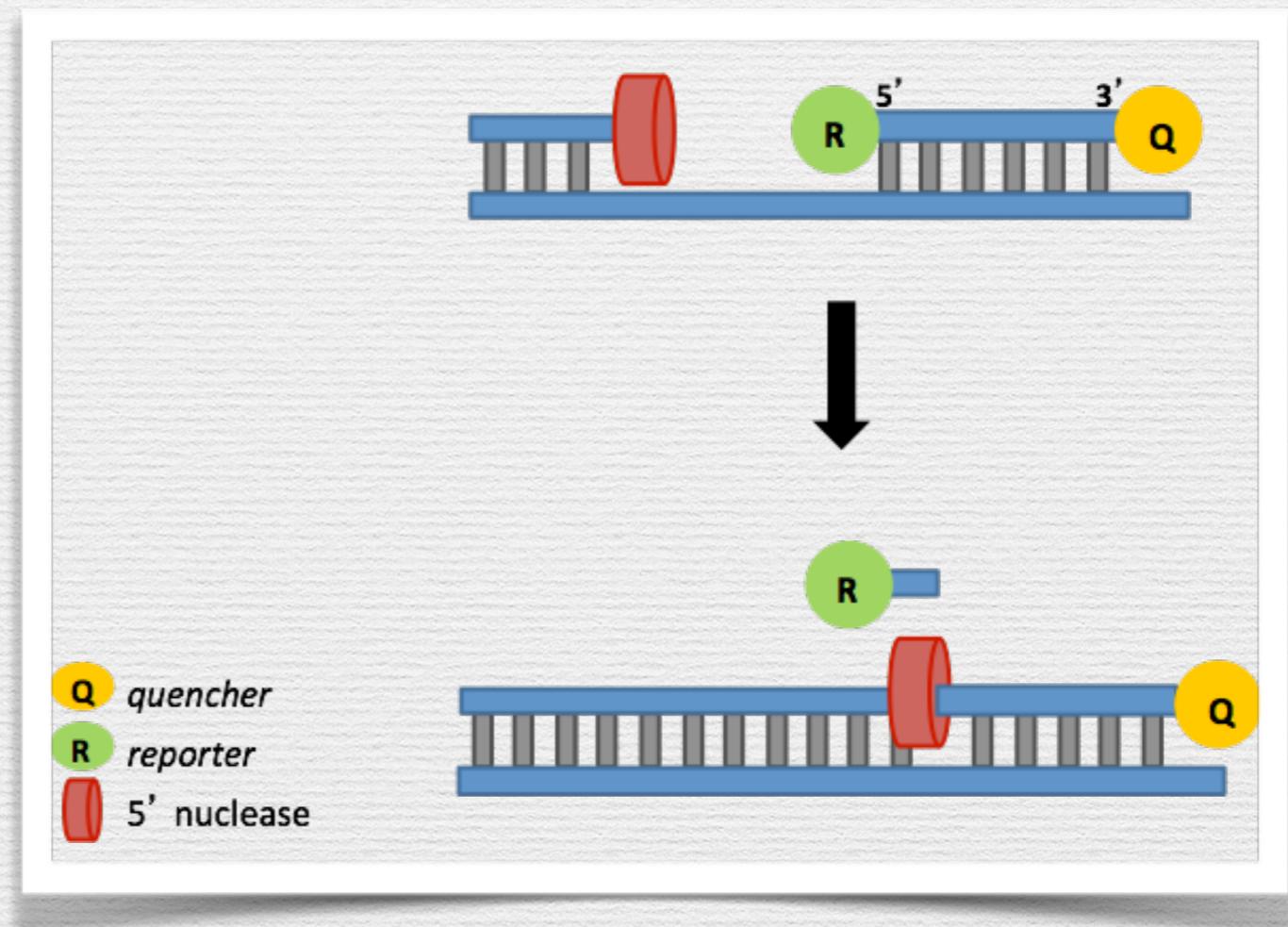
- Menor custo
- Não utiliza sonda
- Curva de dissociação

Desvantagens

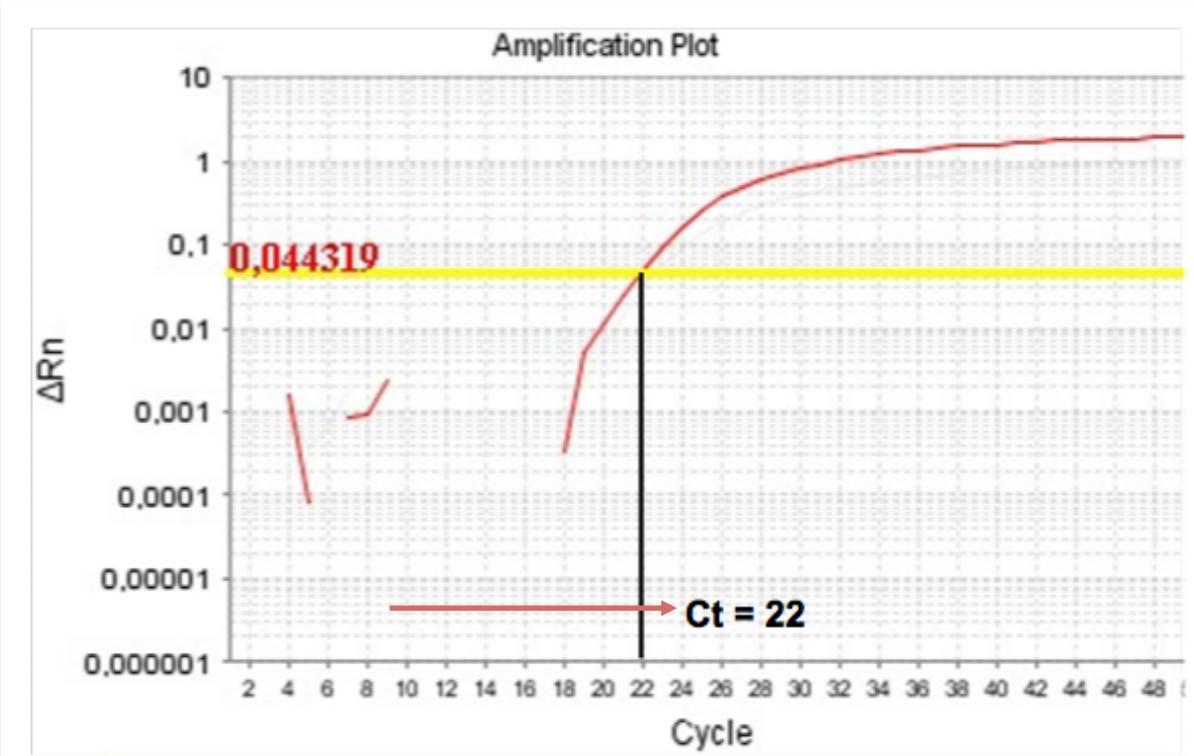
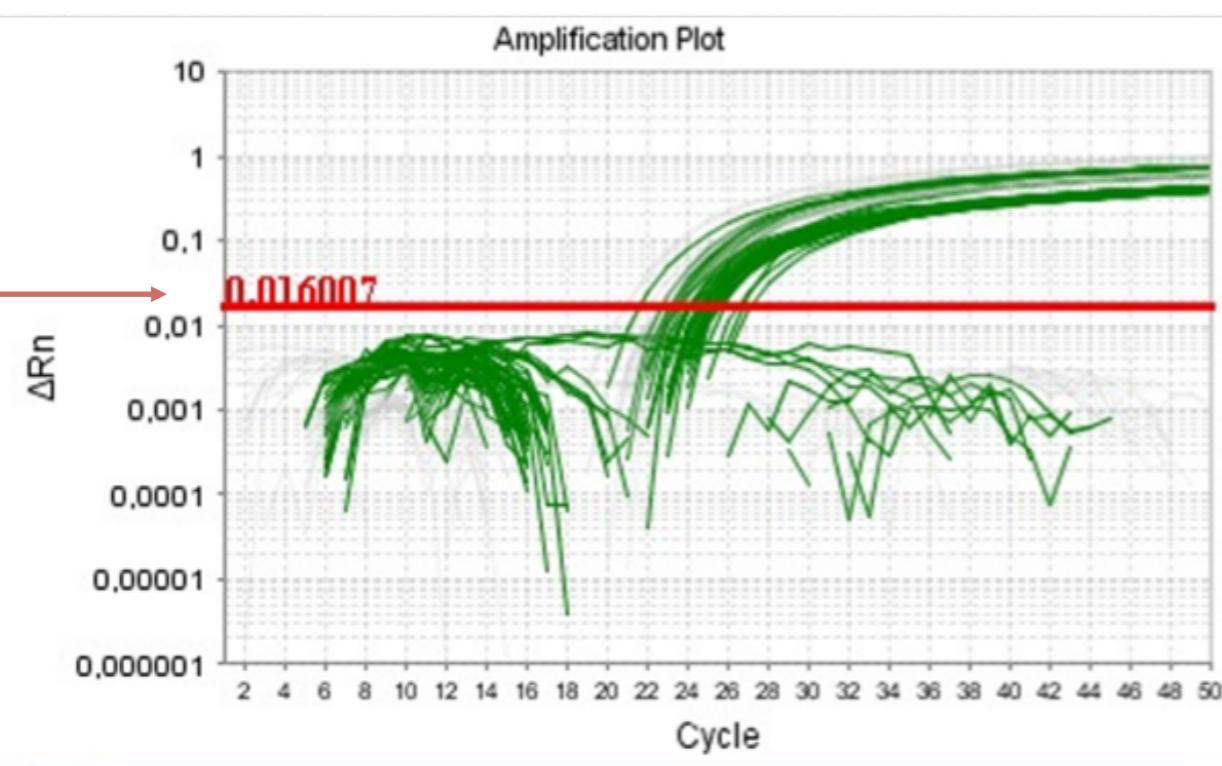
- Inespecífico
- Difícil reação multiplex
- Dependente do tamanho do fragmento

PCR tempo real

Sistema Taqman



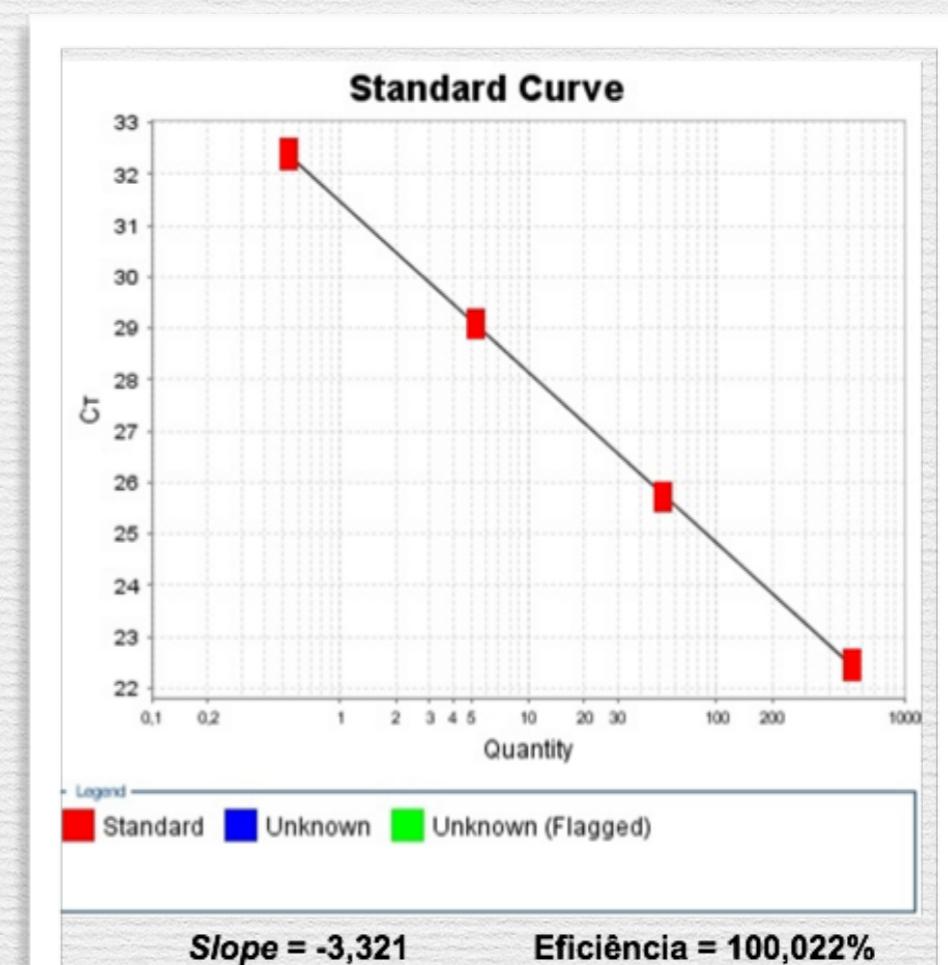
PCR tempo real



PCR tempo real

Eficiência da reação é dependente de:

- Preparo da reação (pipetagem)
- Qualidade do template (integridade do DNA/cDNA)
- Presença de inibidores (qualidade de extração)
- Desenho dos primers (Tm, estruturas secundárias)
- Concentração dos reagentes
- Tamanho do amplicon



PCR tempo real

Sistema de detecção por sondas

Vantagens

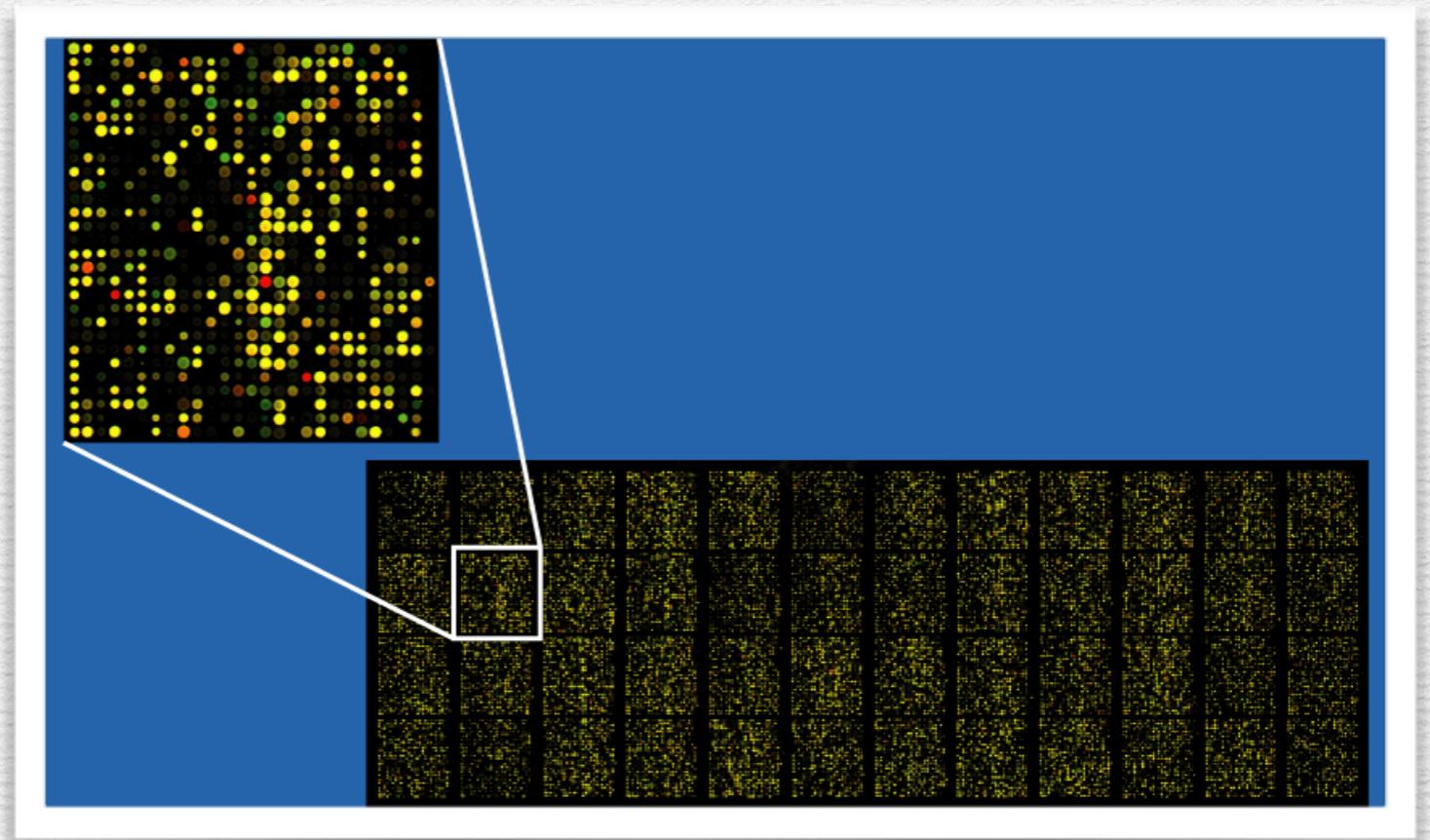
- Altamente sensível e específico
- Permite multiplex
- Menos dependente do tamanho do fragmento

Desvantagens

- Maior custo
- Formação de dímeros e *hairpins* de sondas e primers

Microarray

Lâminas de microscopia com
spots minúsculos

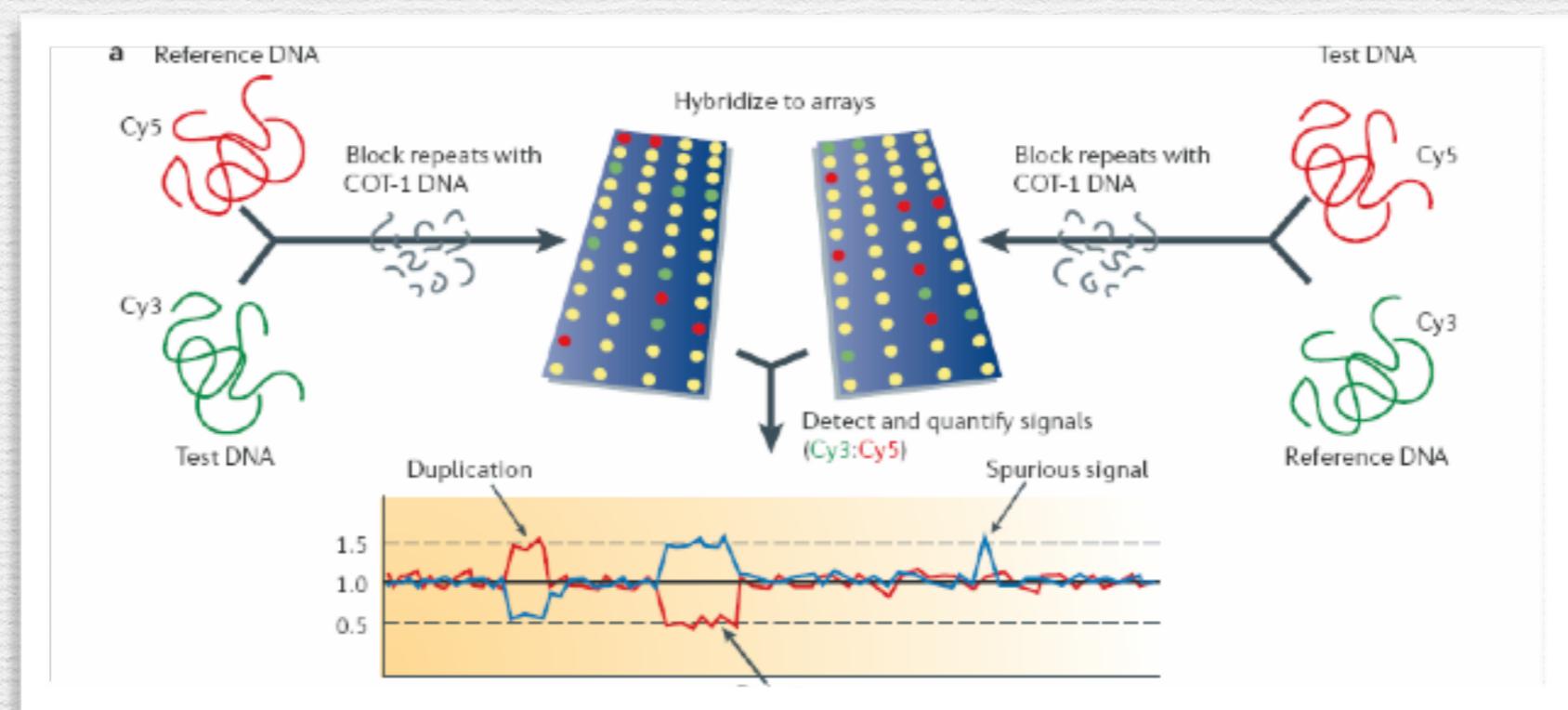


Microarray

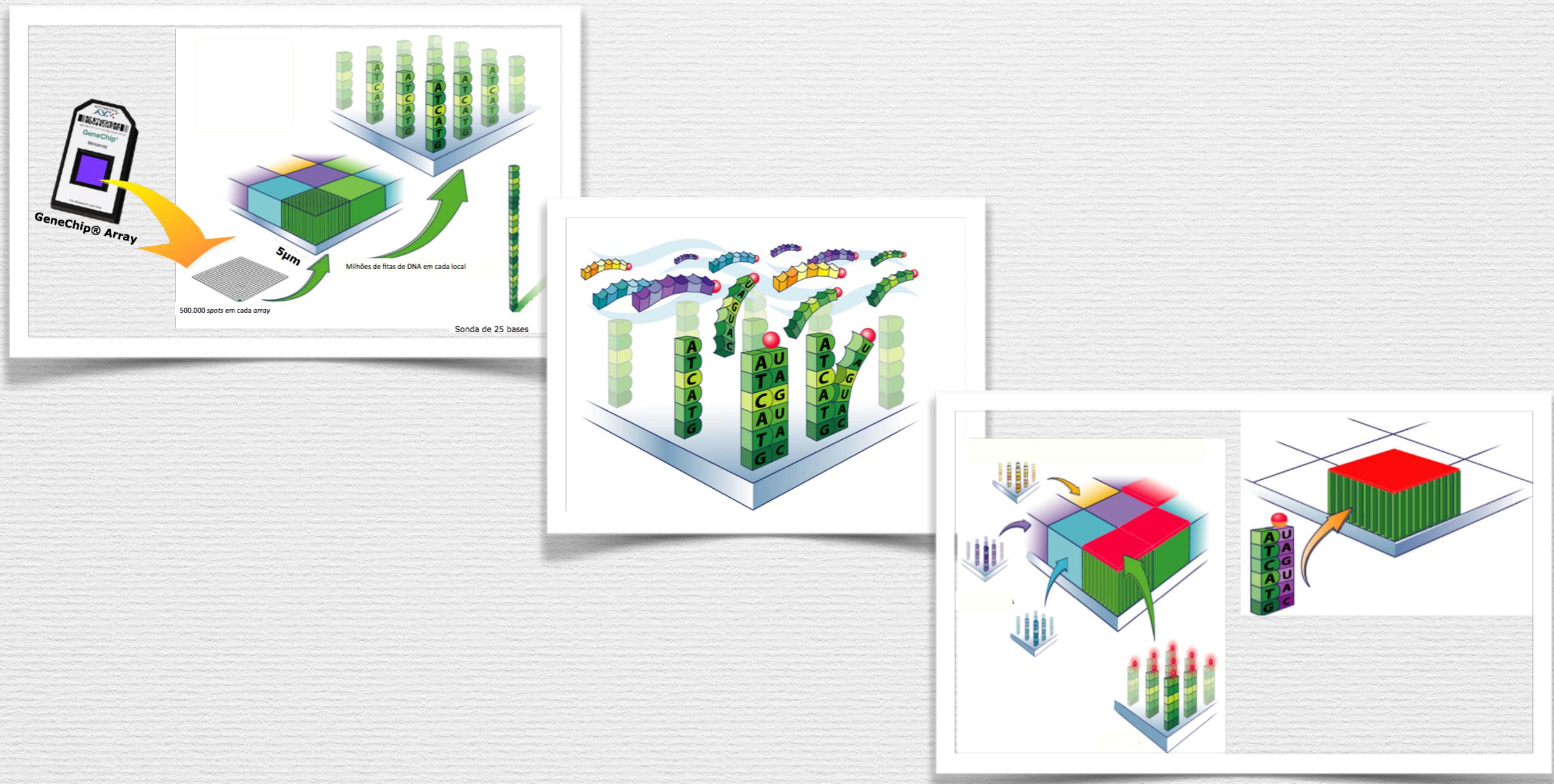
Aplicações

- Perfil de expressão gênica (transcriptoma)
- Genotipagem de polimorfismos em larga escala
- Alterações genômicas estruturais
- Investigação de variações do número de cópias (CNVs)

CGHarray



Microarray



Microarray

Vantagens

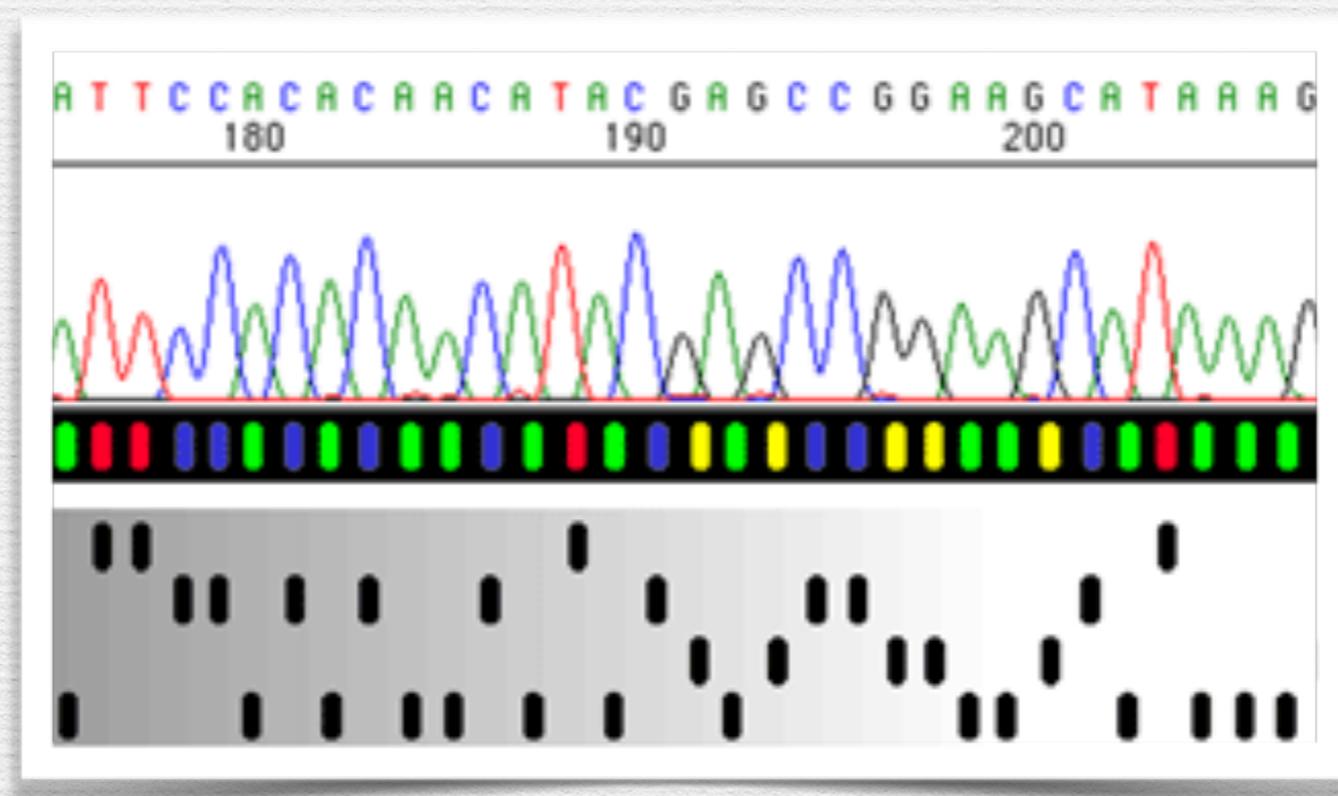
- Grande cobertura genômica
- Análise simultânea de milhares de genes /milhões de variações genéticas
- Não restrito a genes candidatos
- Possibilidade de integração de dados em nível genômico
- Análise de vias biológicas
- Informação qualitativa e quantitativa
- Protocolo fácil e rápido
- Permitiu o desenvolvimento de diversas ferramentas em bioinformática

Microarray

Desvantagens

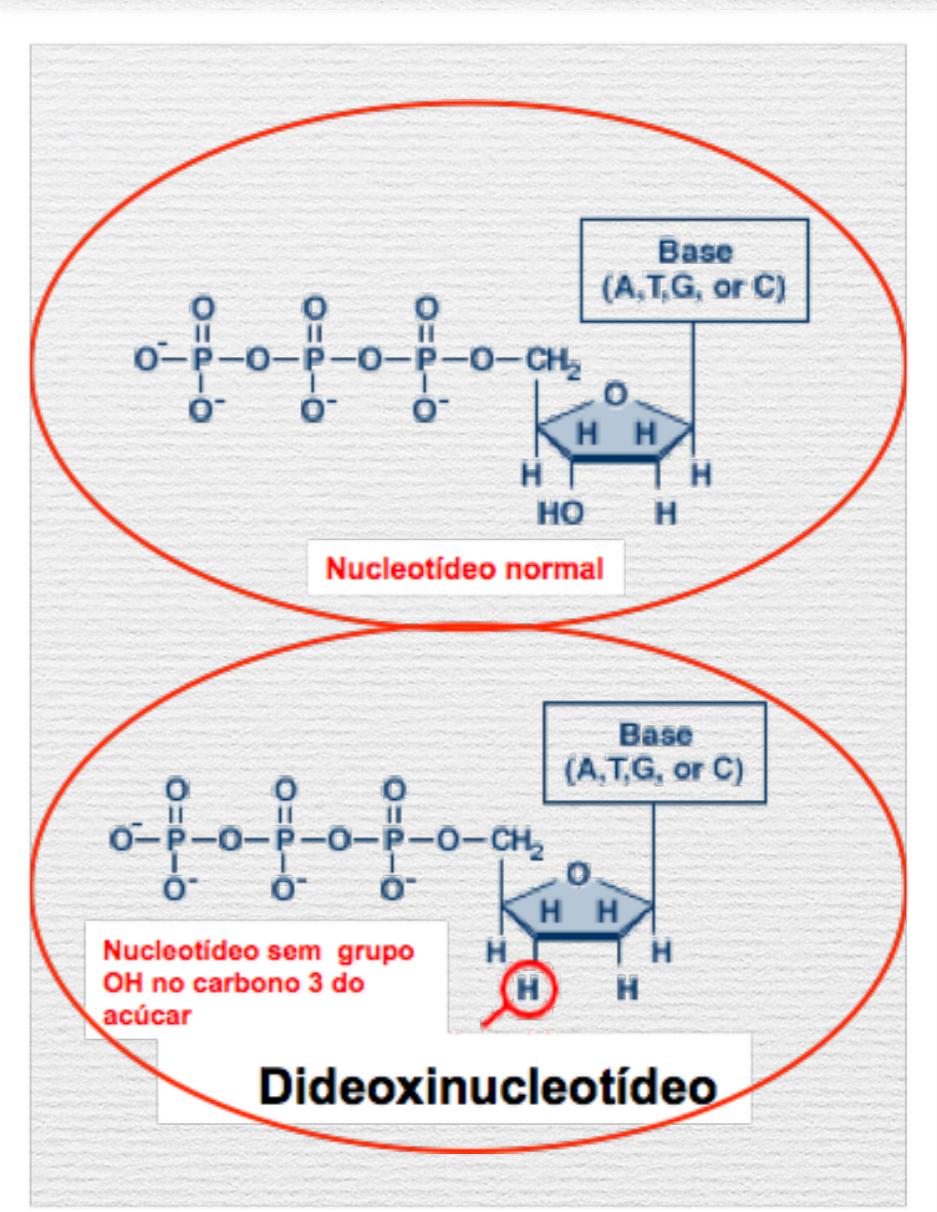
- Limitado a um experimento de triagem somente
- Limitado às sequências gênicas colocadas no suporte
- Necessidade de validação em muitos casos
- Necessidade de domínio para análise completa dos resultados
- Plataforma para rodar experimentos é cara

Sequenciamento de Sanger

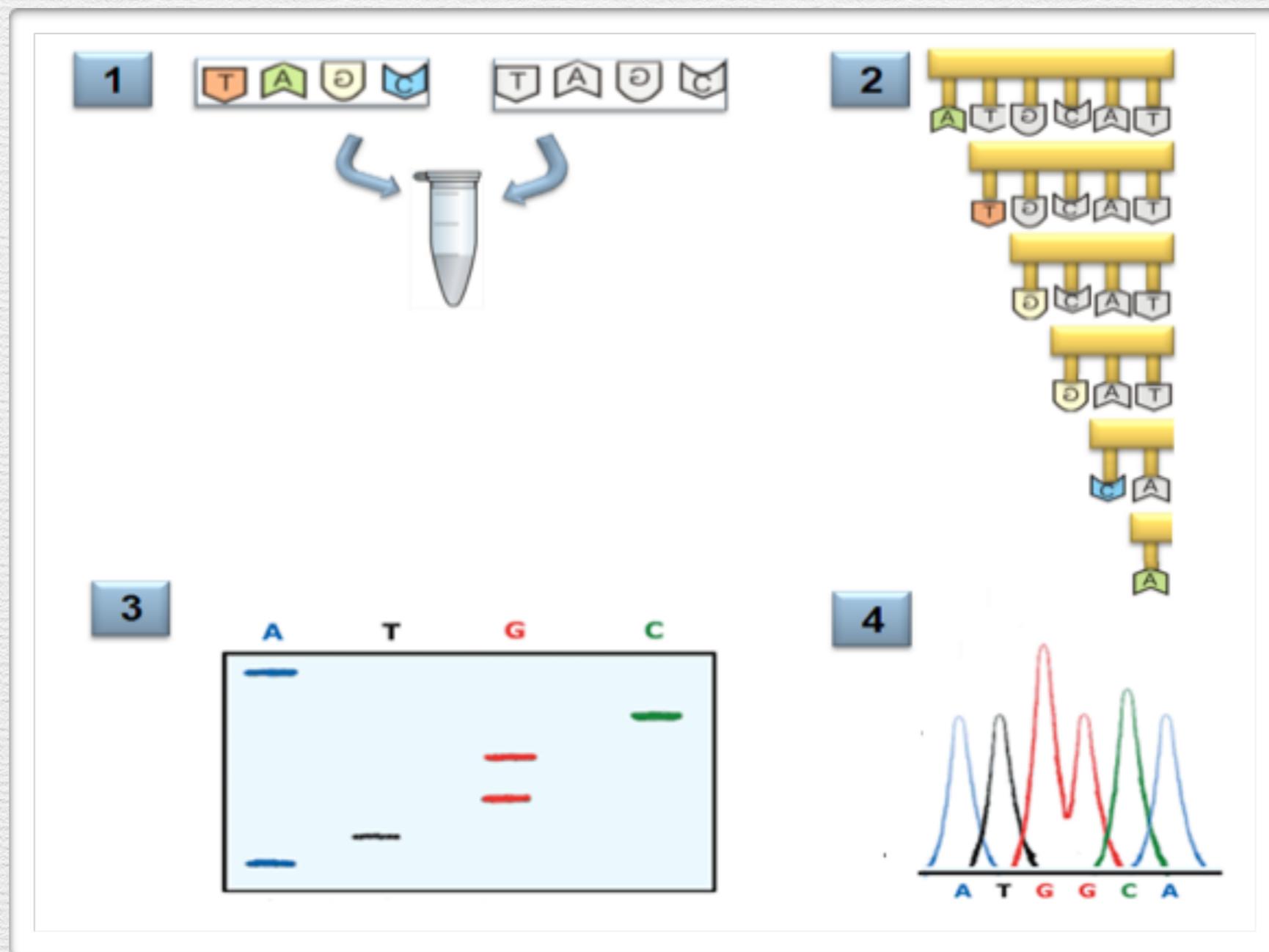


Sequenciamento de Sanger

- Este método baseia-se na adição de nucleotídeos modificados, chamados dideoxinucleotídeos (não contém OH na extremidade 3')
- Cada nucleotídeo (A, T, C e G) é marcado com um fluorocromo diferente que uma vez incitados por um feixe de laser emitem luz em diferentes comprimentos de onda



Sequenciamento de Sanger



Sequenciamento de Sanger

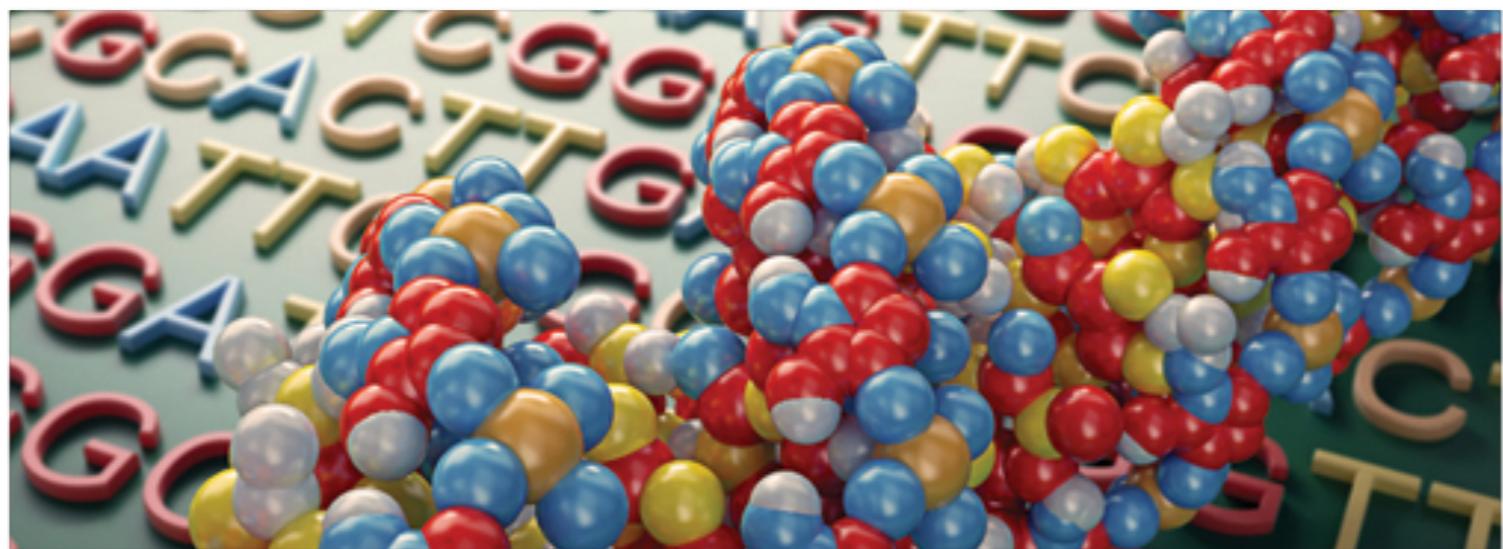
Vantagens

- pequena taxa de erro sistemático
- é mais barata por base sequenciada mas ainda é mais cara por corrida (esperar uma placa ser preenchida)

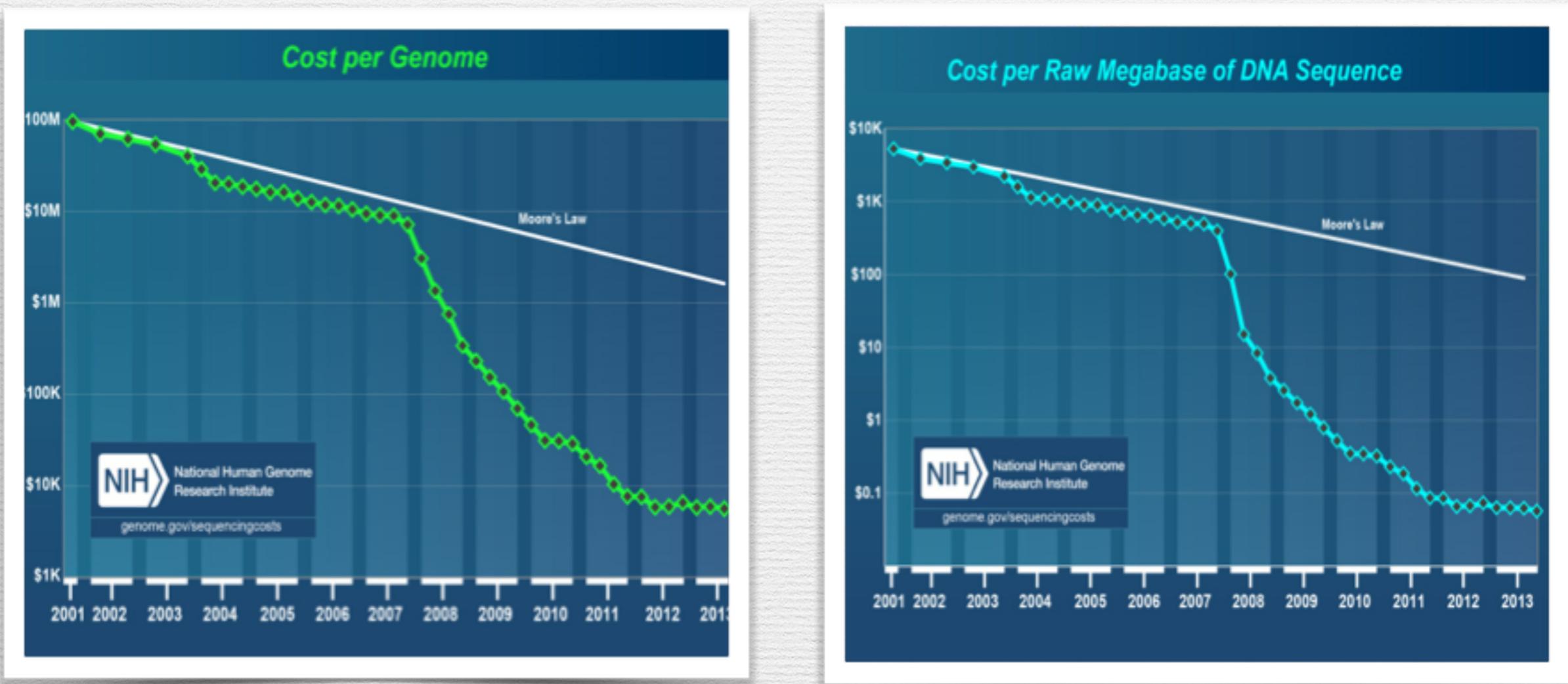
Desvantagens

- Só para sequências pequenas
- Não é quantitativa

Sequenciamento de Nova Geração



Sequenciamento de Nova Geração



<http://www.genome.gov/sequencingcosts>

Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

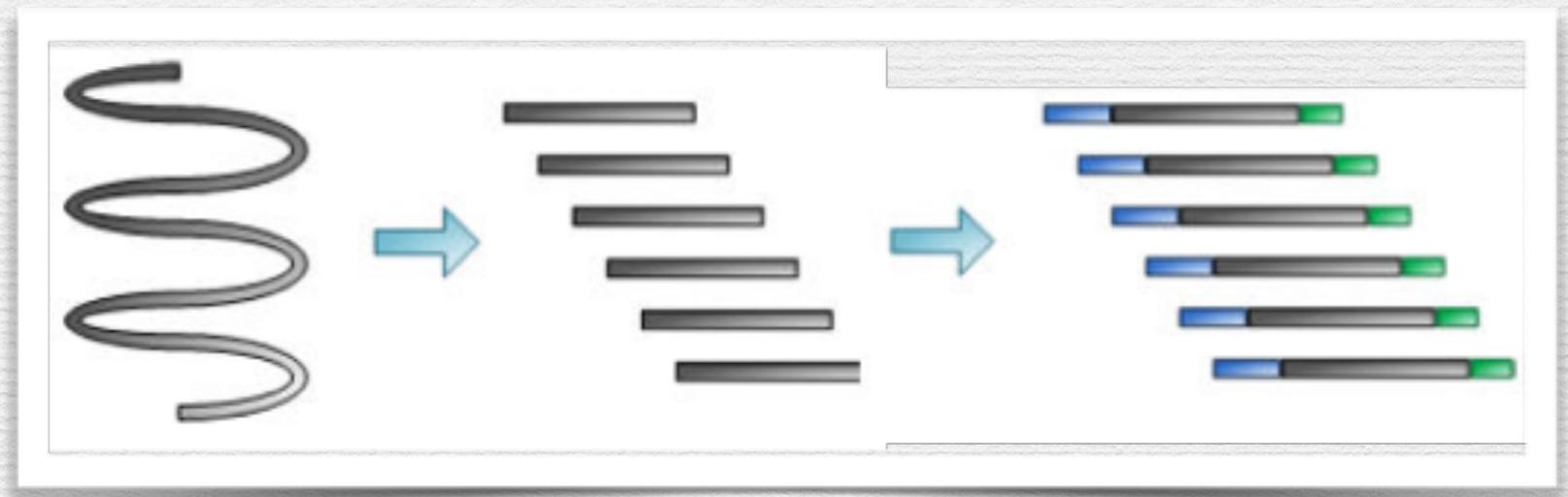
3 estágios

- Preparo da biblioteca de DNA
- Geração de *clusters* de clones
- Sequenciamento

NGS - Ion Torrent PGM

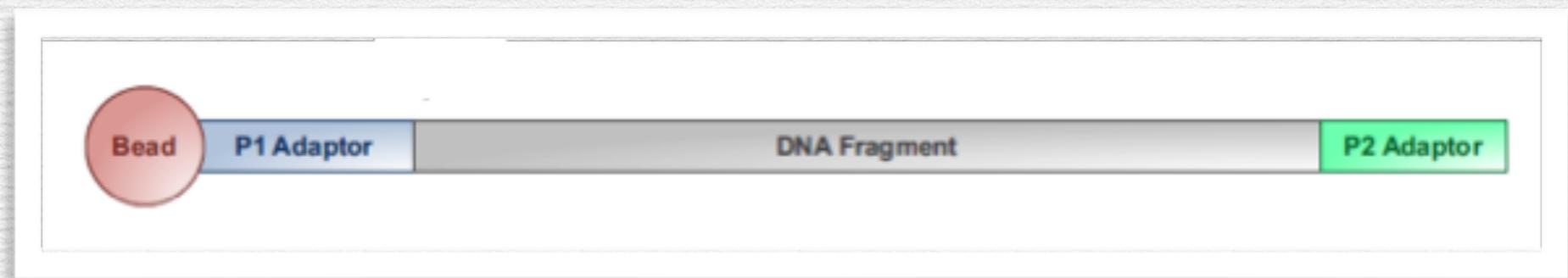
Preparo das bibliotecas

- Fragmentação e ligação de adaptadores



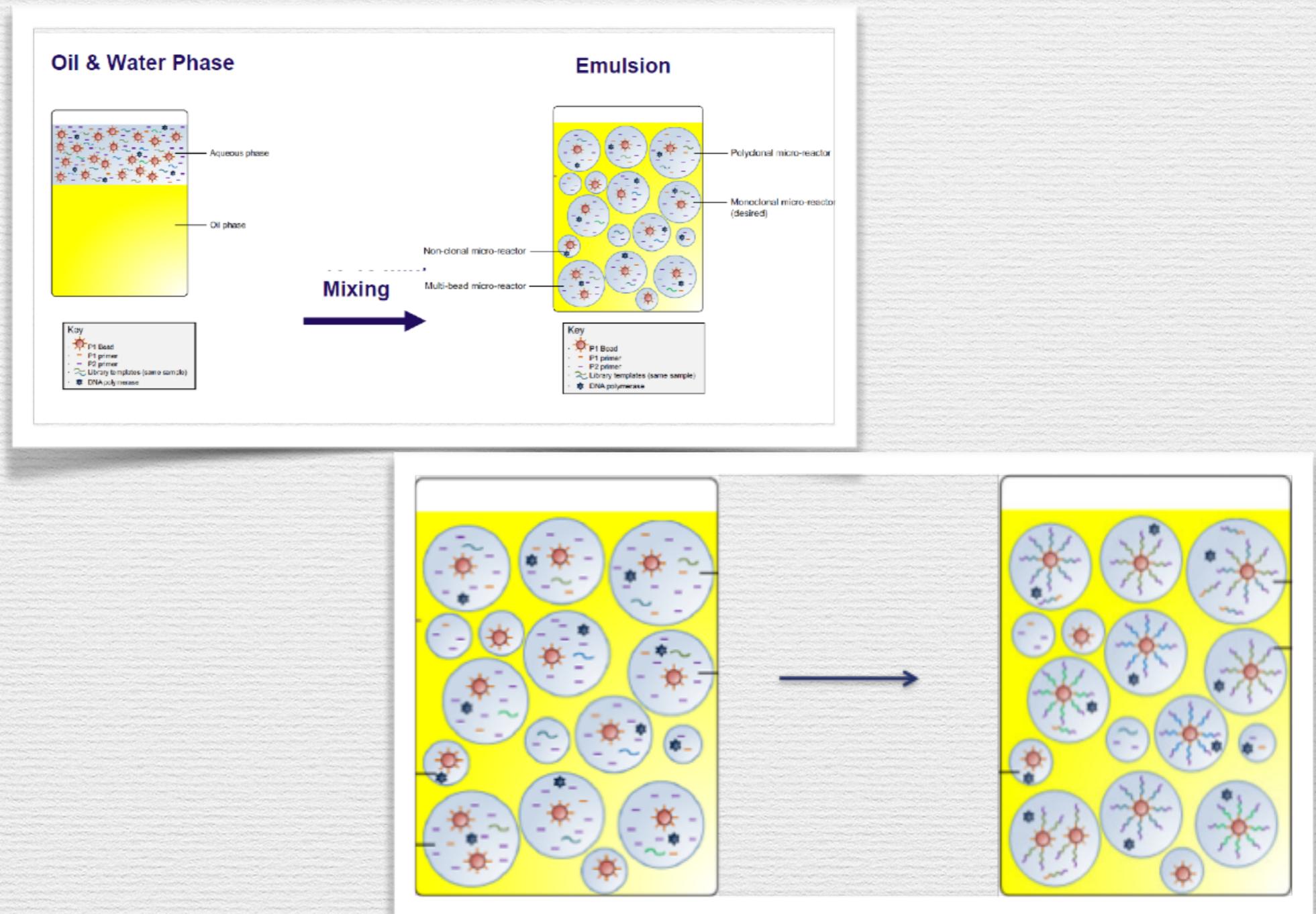
NGS - Ion Torrent PGM

Preparo dos templates

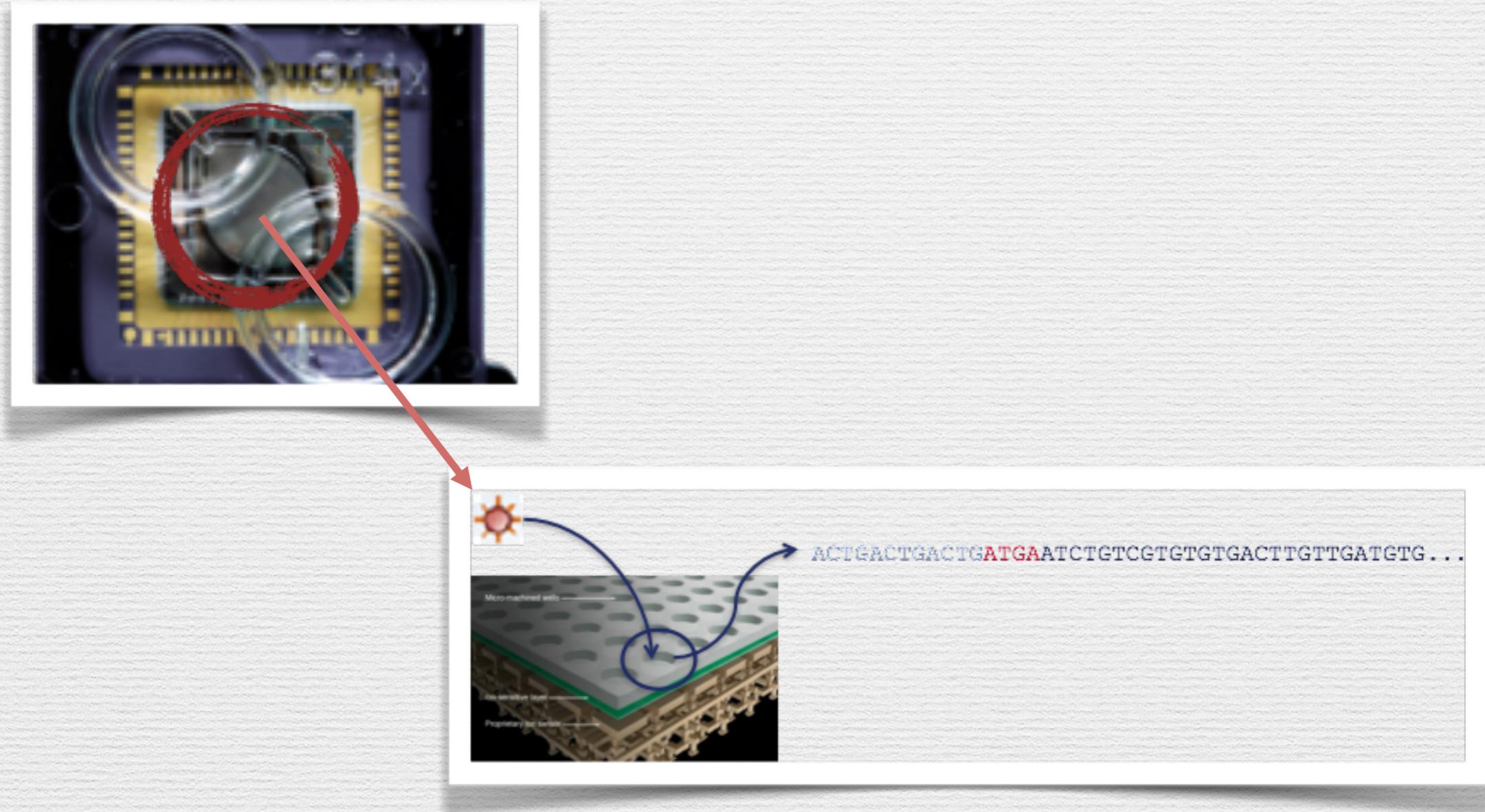


NGS - Ion Torrent PGM

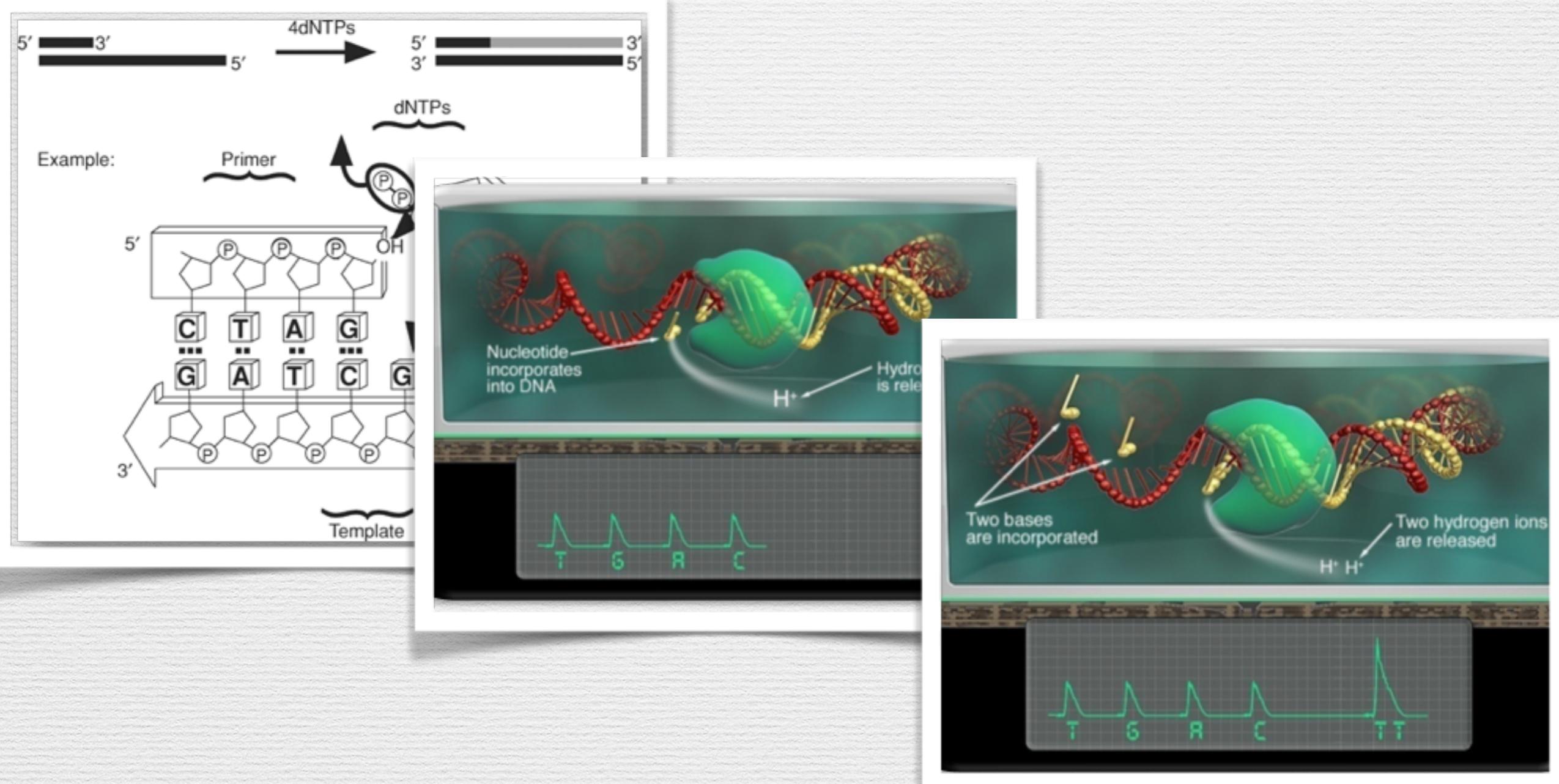
- PCR em emulsão



NGS - Ion Torrent PGM



NGS - Ion Torrent PGM



Sequenciamento de Nova Geração

Vantagens

- alta escala
- quantitativa

Desvantagens

- Estocagem de dados (larga escala)
- Montagem
- Análise



“Fim”

—Sintia Iole Belangero