



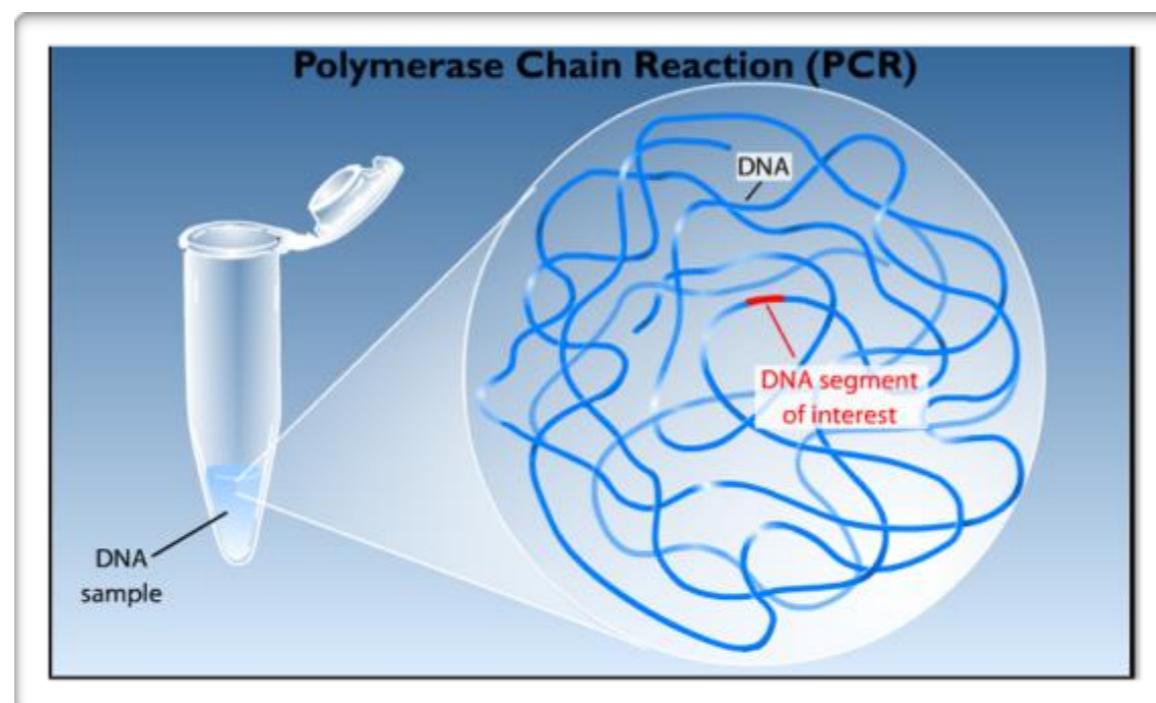
Princípios de metodologias básicas em Genética

Patrícia Natália Oliveira da Silva

Curso de Introdução à Bioinformática Aplicada à Genética

PCR convencional

Descrita pela primeira vez em 1983 por Kari Mullis



PCR convencional

Aplicações

Diagnóstico forense

Diagnóstico clínico

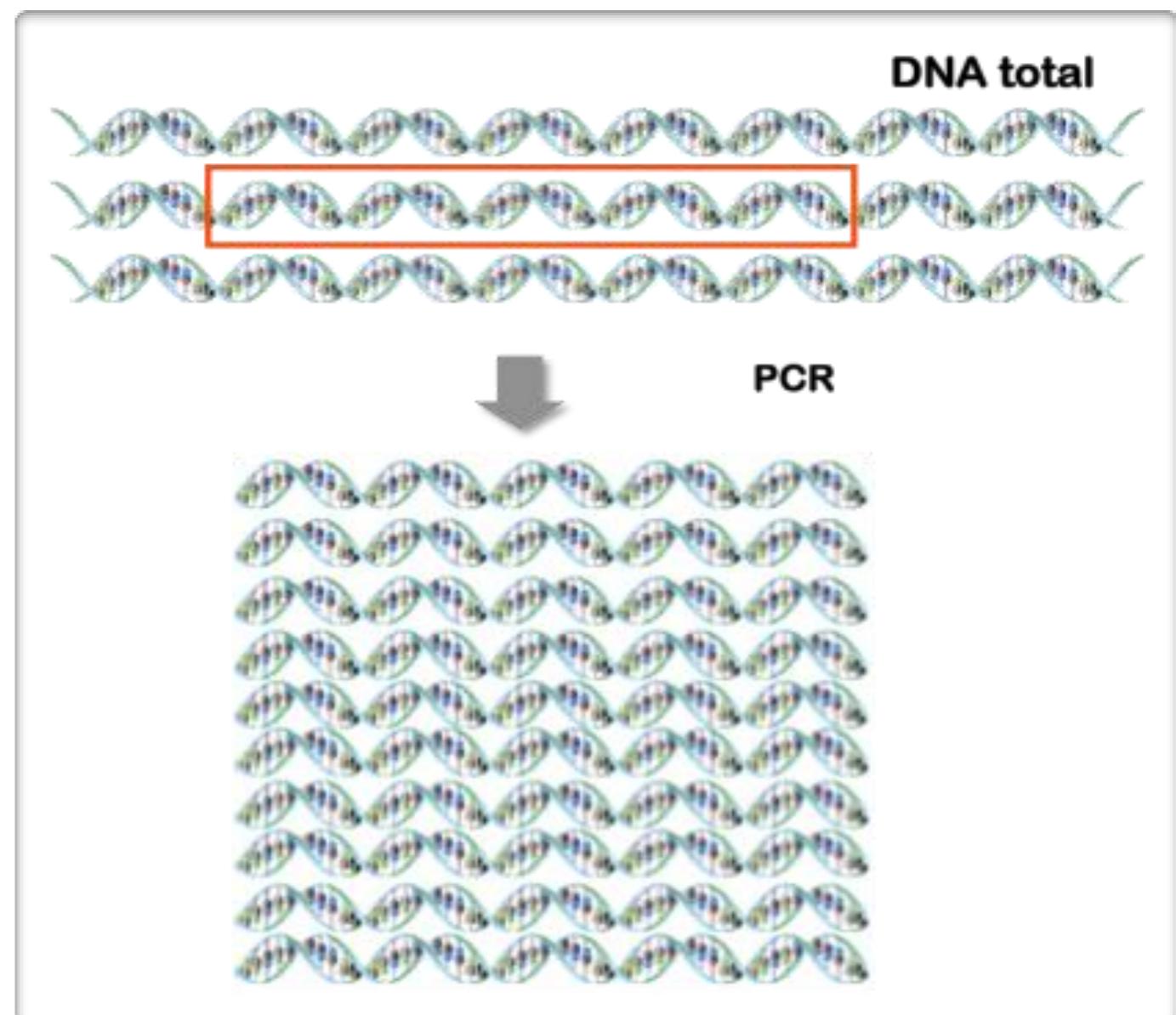
Marcadores moleculares

Expressão gênica

Seleção de clones
recombinantes

Sequenciamento direto de
produtos de PCR

Estudos evolutivos



PCR convencional

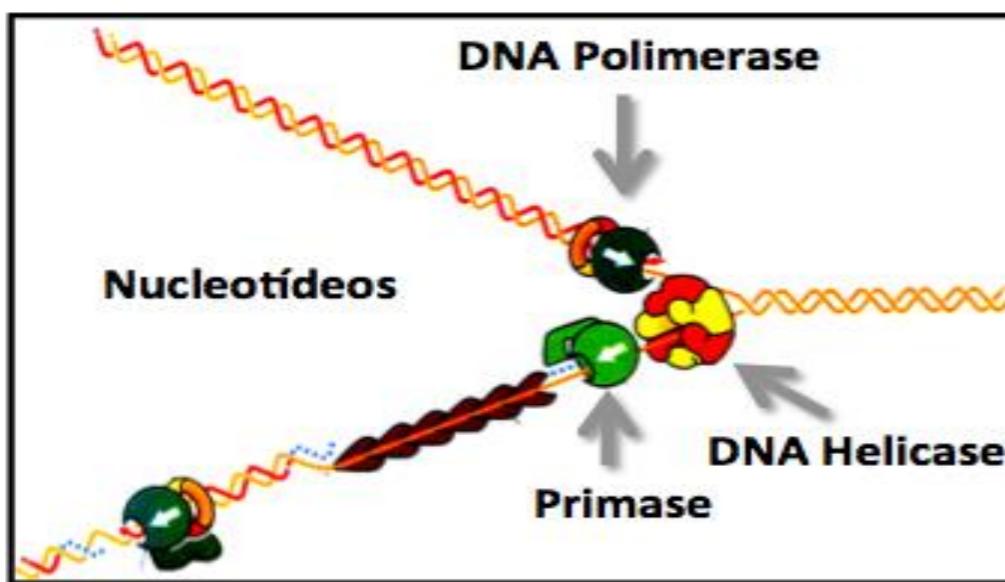
Termociclador



PCR convencional



In vivo



In vitro

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

PCR convencional

Princípios:

Taq Polimerase

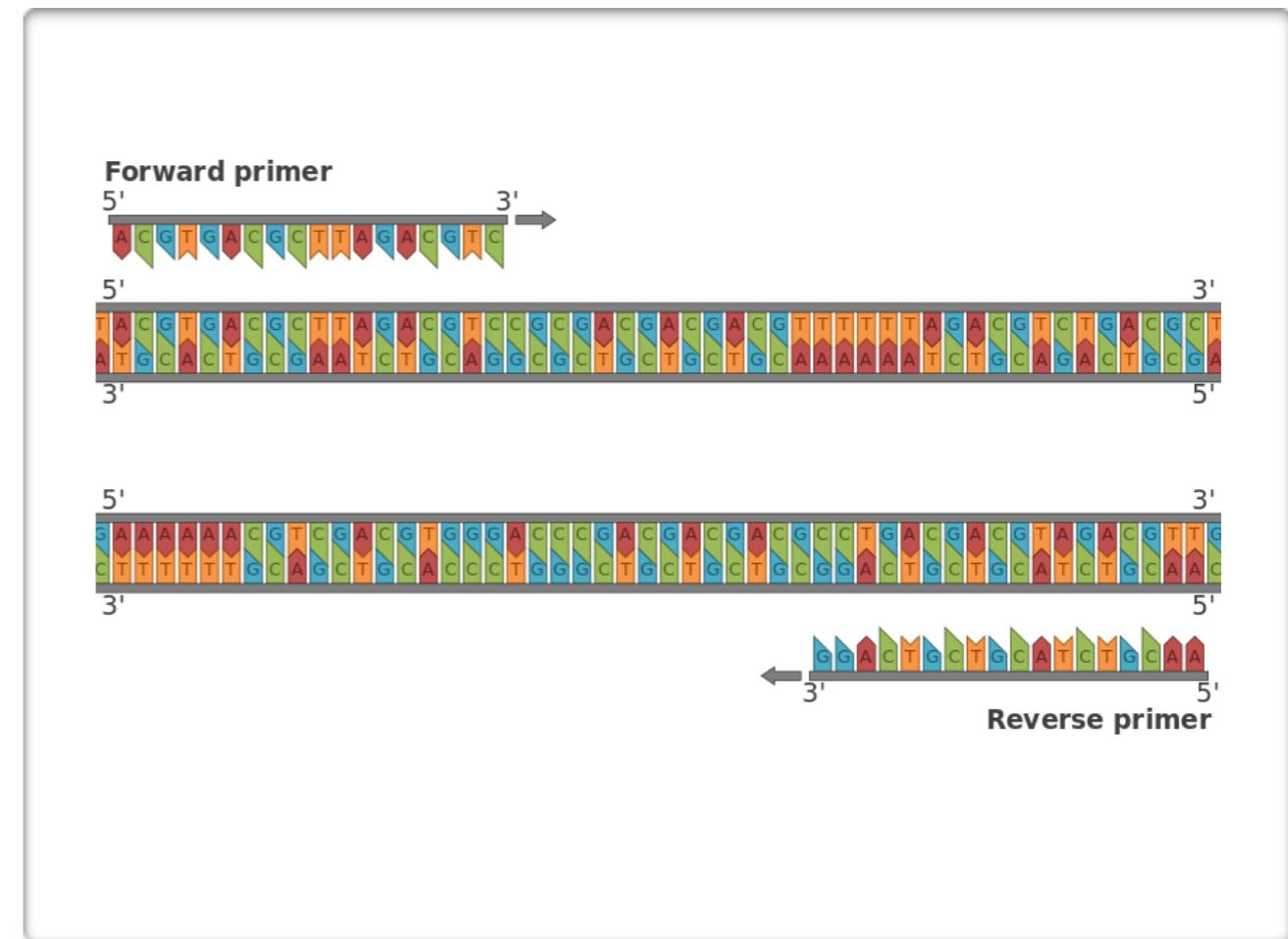
Enzima da bactéria *Thermus aquaticus*



PCR convencional

Primers são específicos

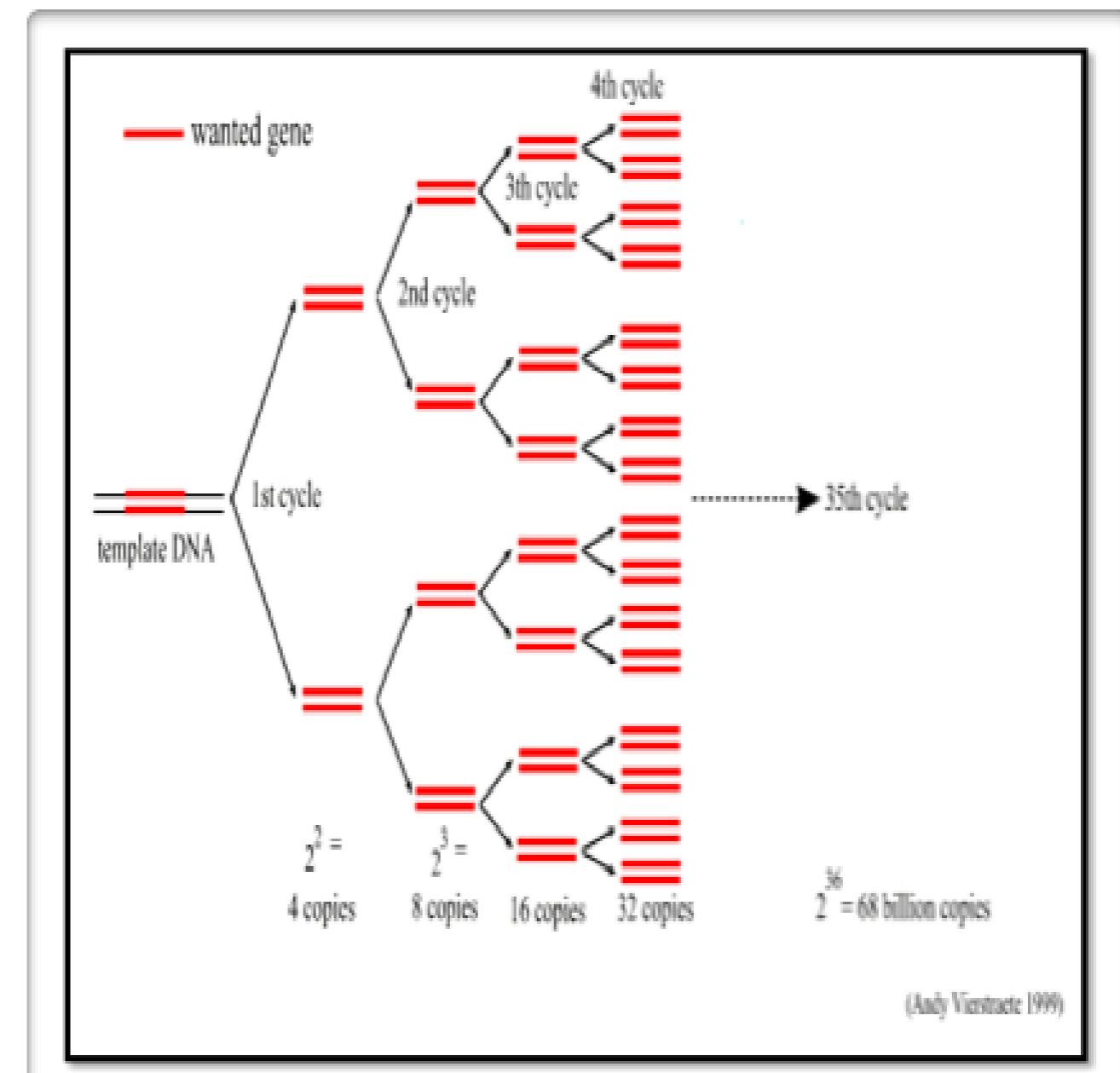
- 1 nucleotídeo = 1/4
- 2 nucleotídeos = 1/16
- 3 nucleotídeos = 1/64
- 4 nucleotídeos = 1/256
- 20 nucleotídeos = 1/1.099.511.627.776



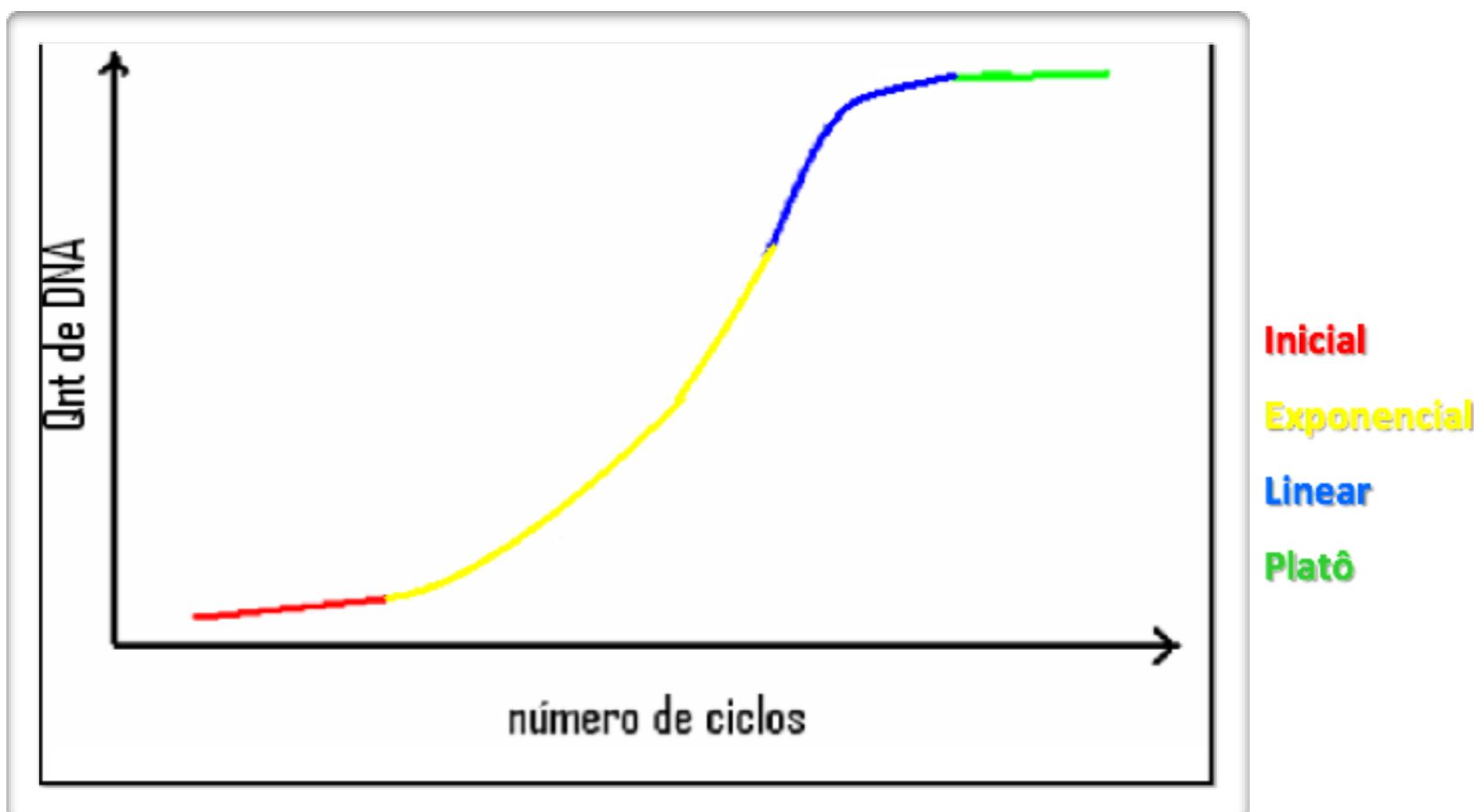
PCR convencional

Amplificação exponencial

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

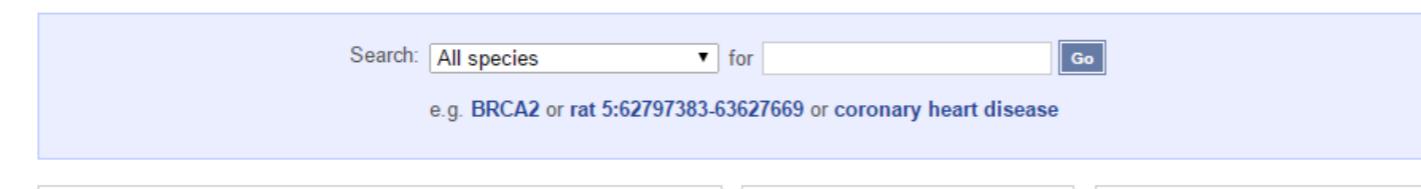
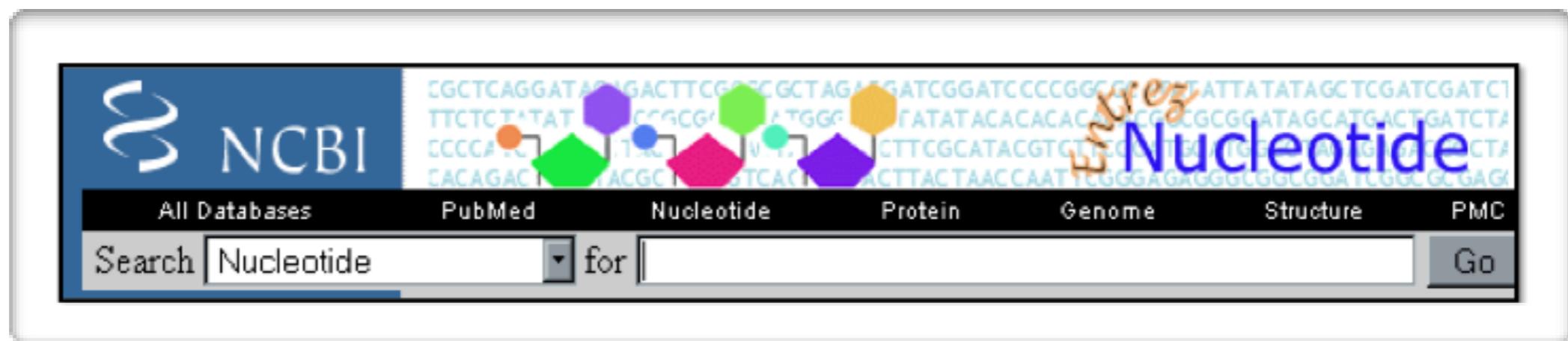


PCR convencional



PCR convencional

Como escolher os primers?
NCBI, Ensembl, etc



- Loadin
- e! Search all species...
-
- What's New in Release 77 (October 2014)
- GENCODE 21 on human GRCh38
 - First Ensembl-Havana rat merge
 - New species: Vervet African green monkey

PCR convencional

Modelo hipotético:

Seqüência nucleotídica do gene da proteína receptora de "LDL"

5' AATCCACATCTGCTGGAAAGGTGGACTGGGAAGGCCAGGATGGAGGCCACCGATCCAGACGGAGTACTTCCTCTCAGGAGGGAGCAATGATCTTGCTATGCCCTTCGA3'
3' TTAGGTGTAGACGACCTTCCACCTGACCCCTTCGGTCCCTACCTCGGTGGCTAGGTCTGCCTCATGAAGGAGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACGATAACGCGAAGCT5'
5' AATCCACATCTGCTGGAAAGGTGGACTGGGAAGGCCAGGATGGAGGCCACCGATCCAGACGGAGTACTTCCTCTCAGGAGGGAGCAATGATCTTGCTATGCCCTTCGA3'
3' TTAGGTGTAGACGACCCCTTCCACCTGACCCCTTCGGTCCCTACCTCGGTGGCTAGGTCTGCCTCATGAAGGAGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACGATAACGCGAAGCT5'

Projetando os "primers"...

Deleção relacionada com acúmulo de colesterol nos vasos sanguíneos

5' AATCCACATCTGCTGGAAAGGTGGACTGGGAAGGCCAGGATGGAGGCCACCGATCCAGACGGAGTACTTCCTCTCAGGAGGGAGCAATGATCTTGCTATGCCCTTCGA3'
3' TTAGGTGTAGACGACCCCTTCCACCTGACCCCTTCGGTCCCTACCTCGGTGGCTAGGTCTGCCTCATGAAGGAGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACGATAACGCGAAGCT5'



5' CTGGAAAGGTGGACTGGGA3'



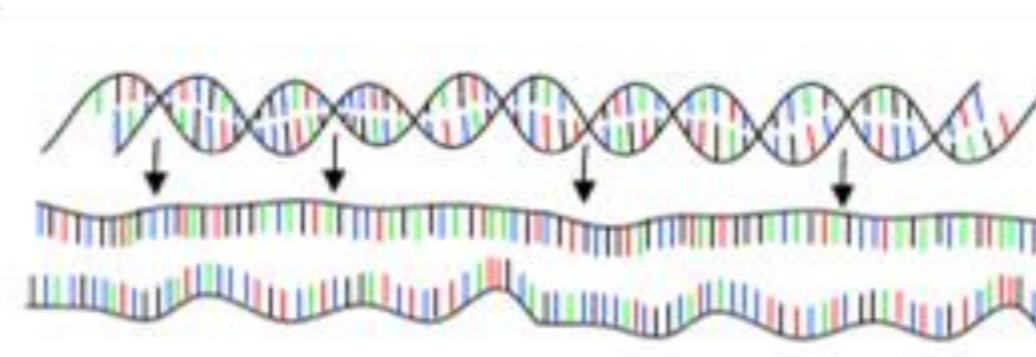
3' CTAGAACGATAACGCGA5'

PCR convencional

Condições

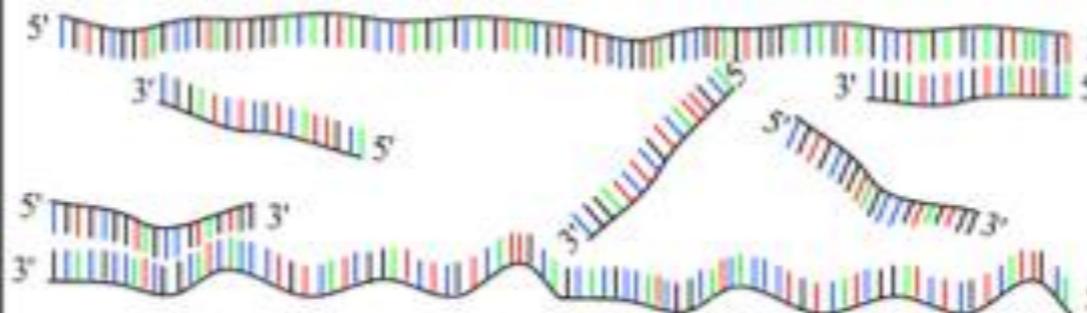
1. Desnaturação

1min – 95 ° C



2. Primers

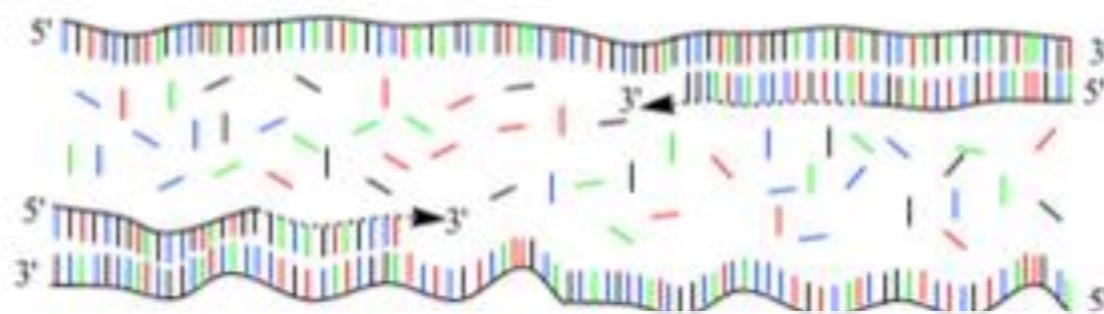
30s – 45/60° C



28-35 ciclos

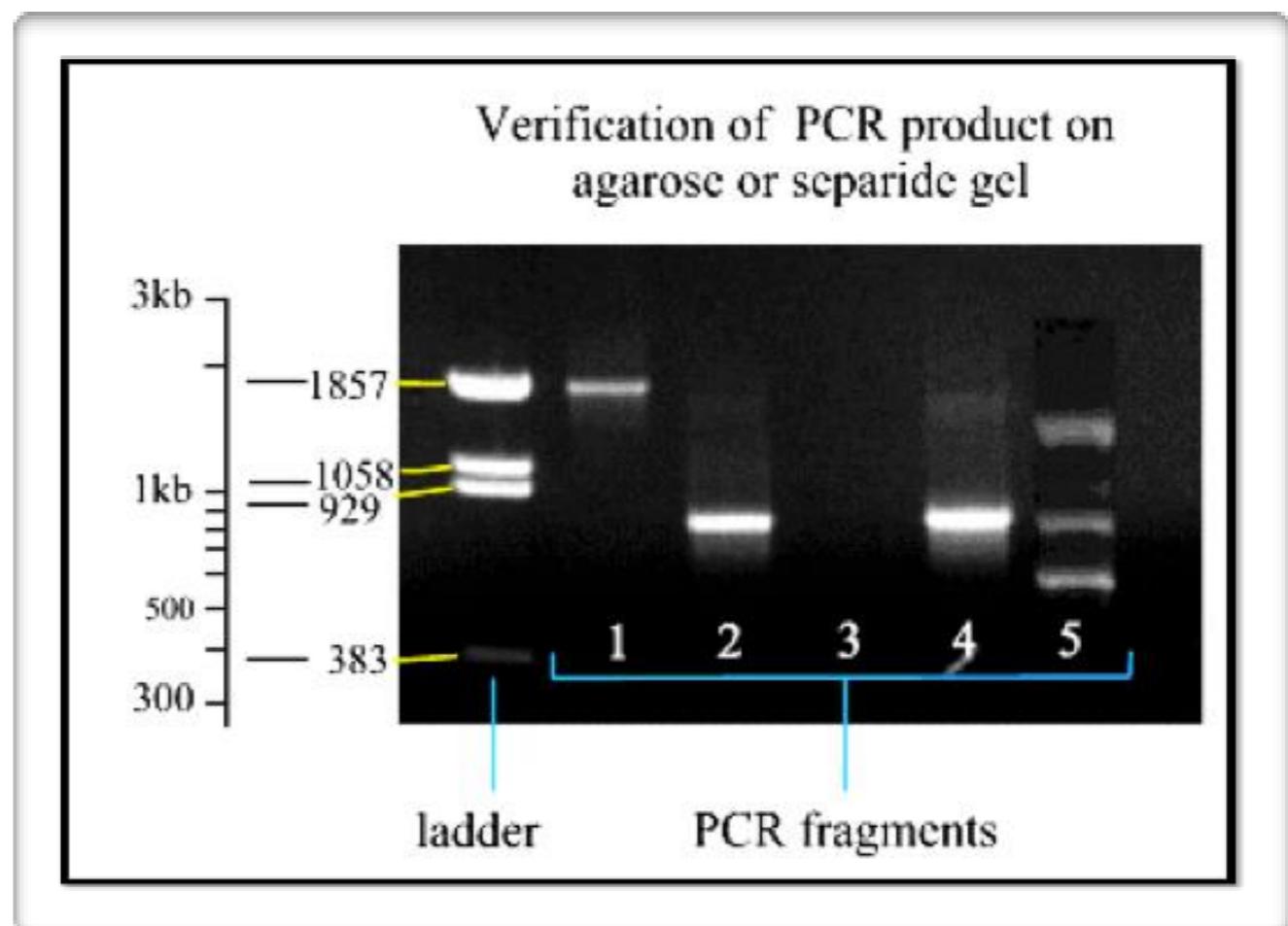
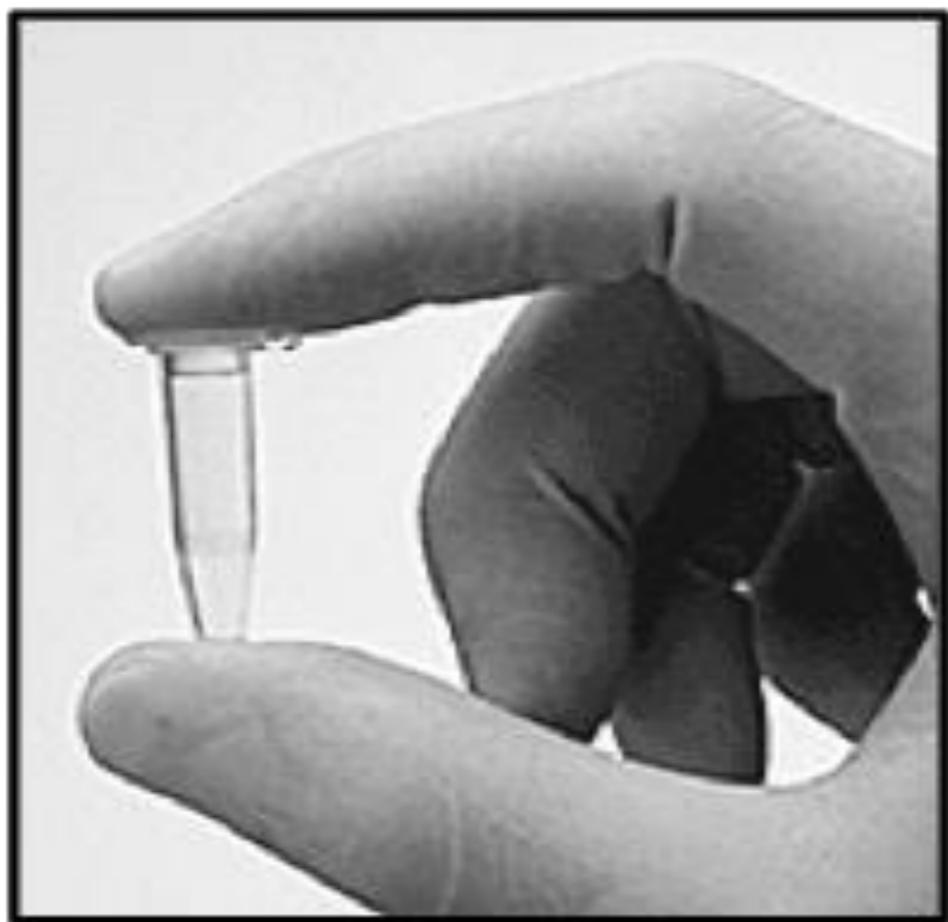
3. Extensão

1min/kb – 72° C



PCR convencional

Detecção do produto



PCR em tempo real

Descrita por Higuchi et al., 1992.



PCR tempo real

Princípio: similar à PCR convencional;

- Diferenças no sistema de detecção que é feita em tempo real pelo software acoplado ao equipamento.
- Quantitativa

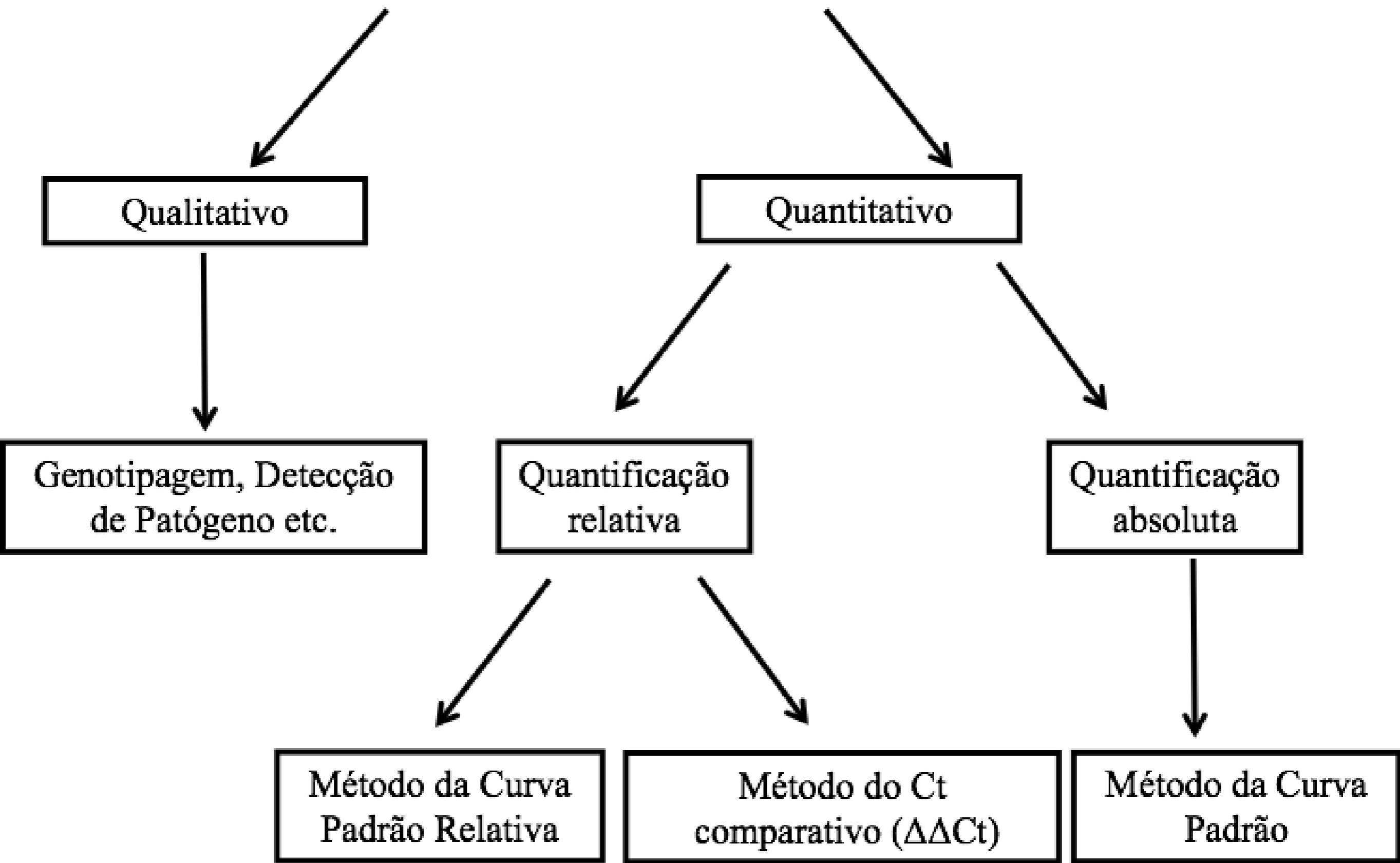


PCR tempo real

Aplicações

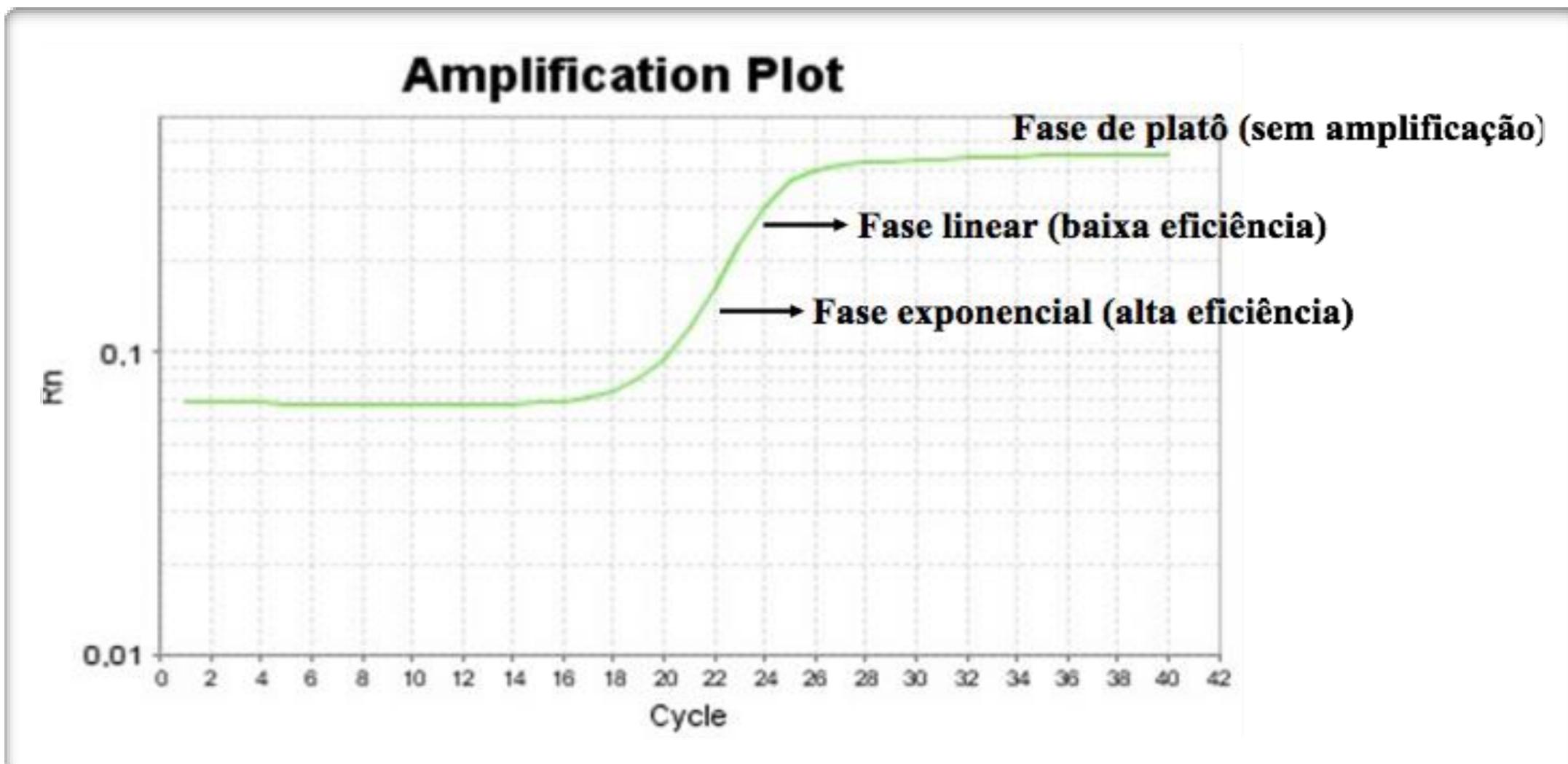
- Genotipagem
- Mutação
- Translocações
- Detecção de patógenos
- Carga viral
- Expressão Gênica
- Validação de experimentos
- Transgênico
- MicroRNA
- siRNA
- Detecção de número de cópias (CNVs)

PCR em tempo real



PCR tempo real

Etapas de amplificação



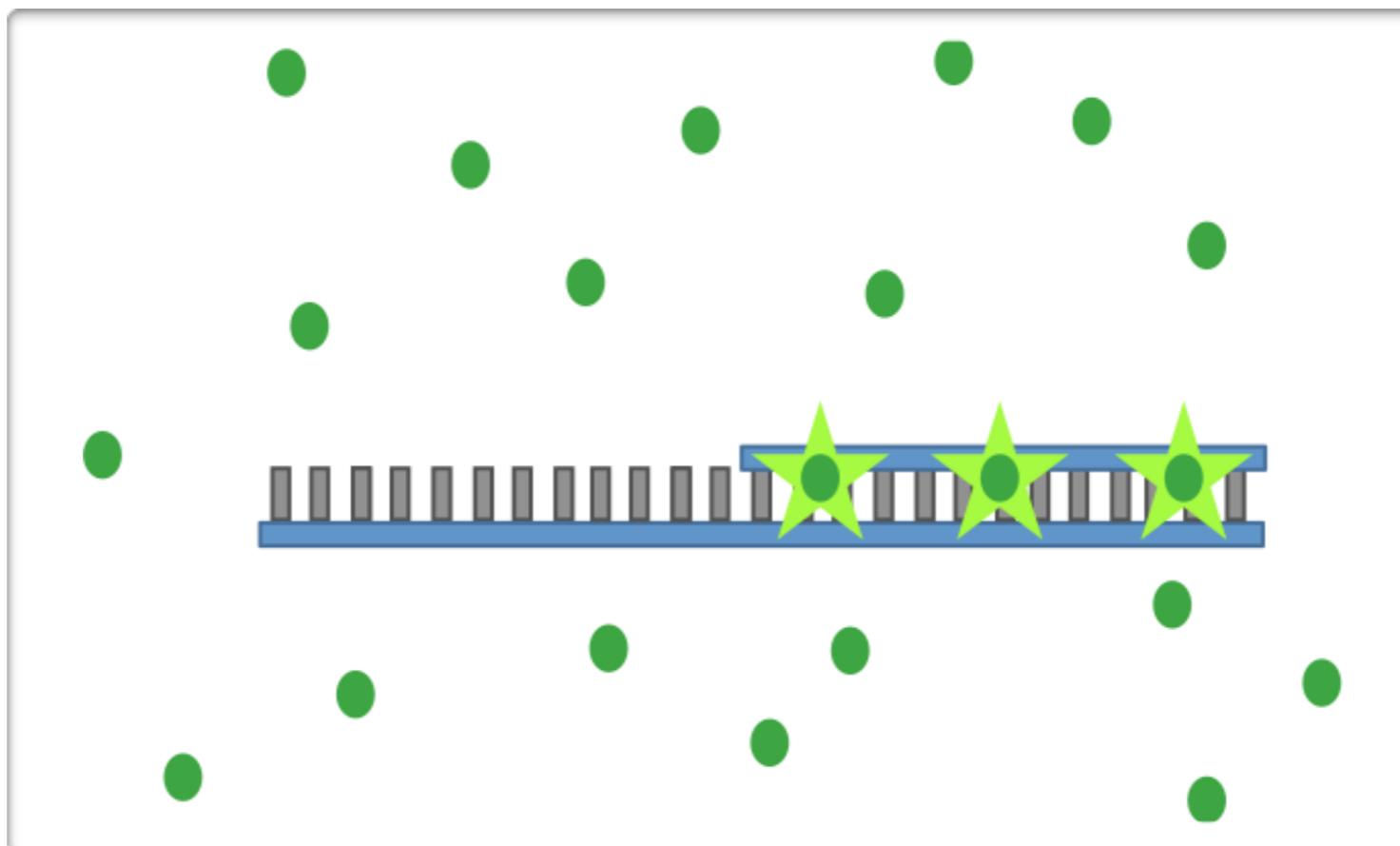
PCR tempo real

Sistema de detecção

- Intercalantes
- Sonda e primers

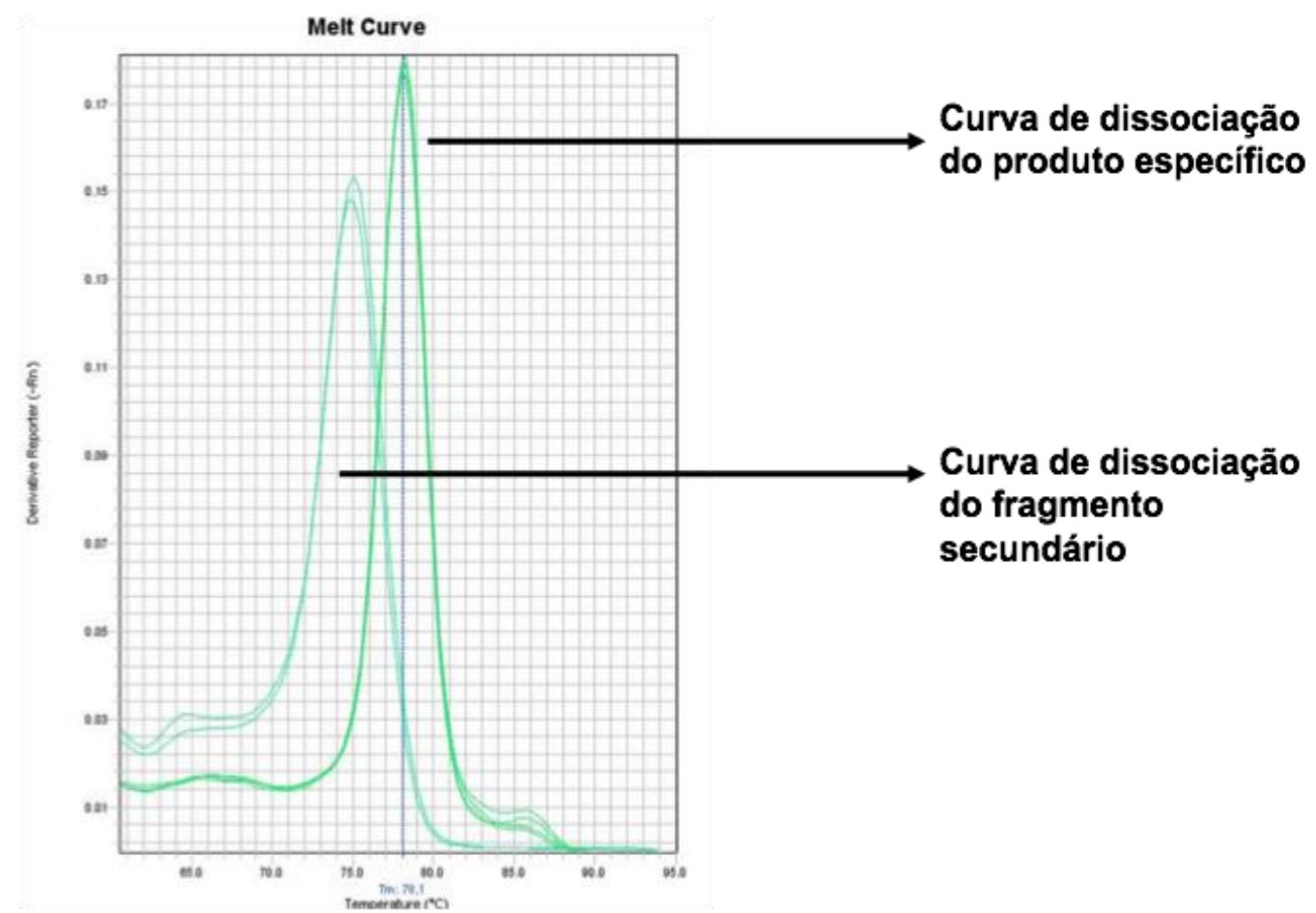
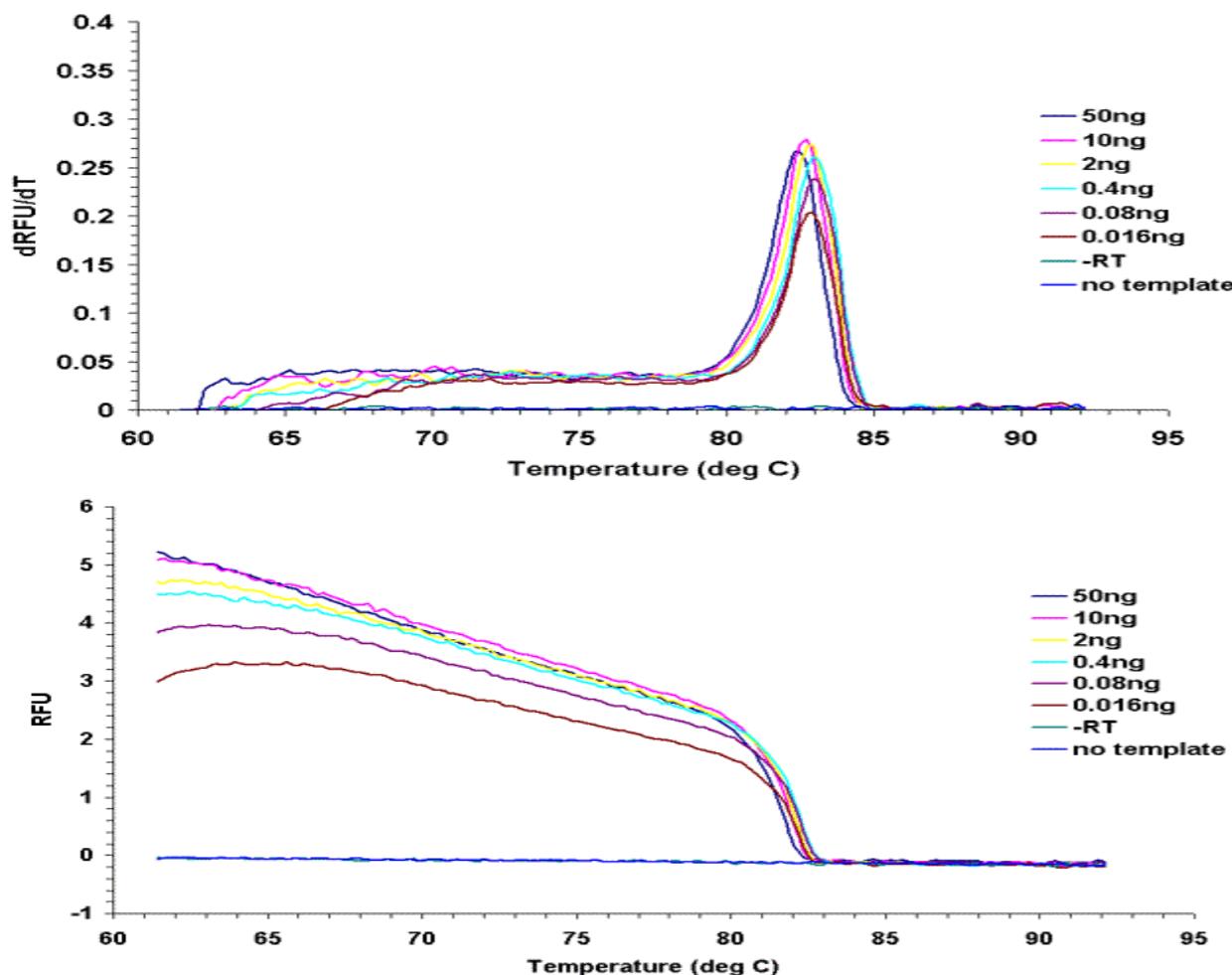
PCR tempo real

Intercalantes



PCR tempo real

Necessário fazer curva de *Melting*



PCR tempo real

Intercalantes

Vantagens

Menor custo

Não utiliza sonda

Curva de dissociação

Desvantagens

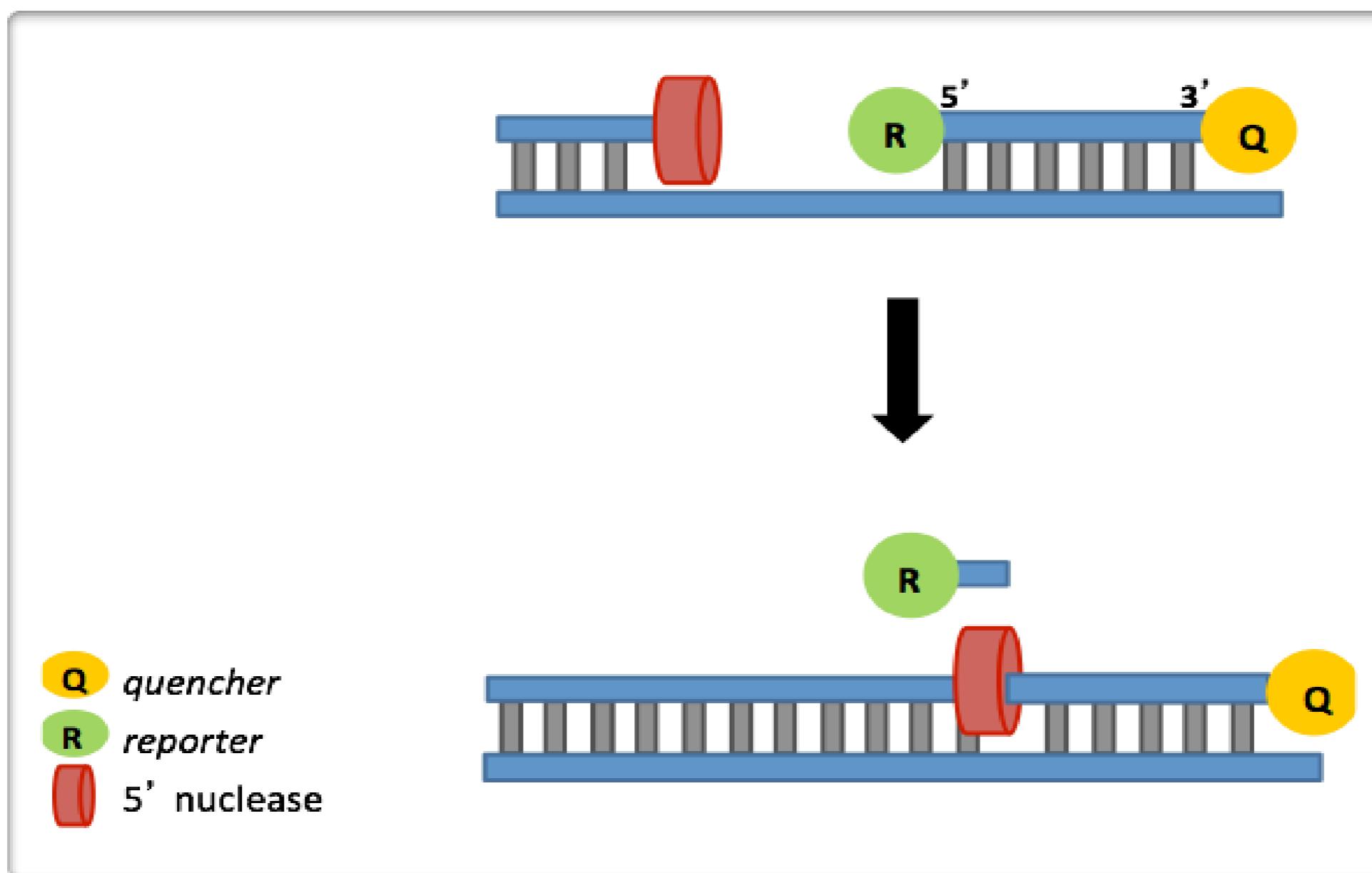
Inespecífico

Não permite multiplex

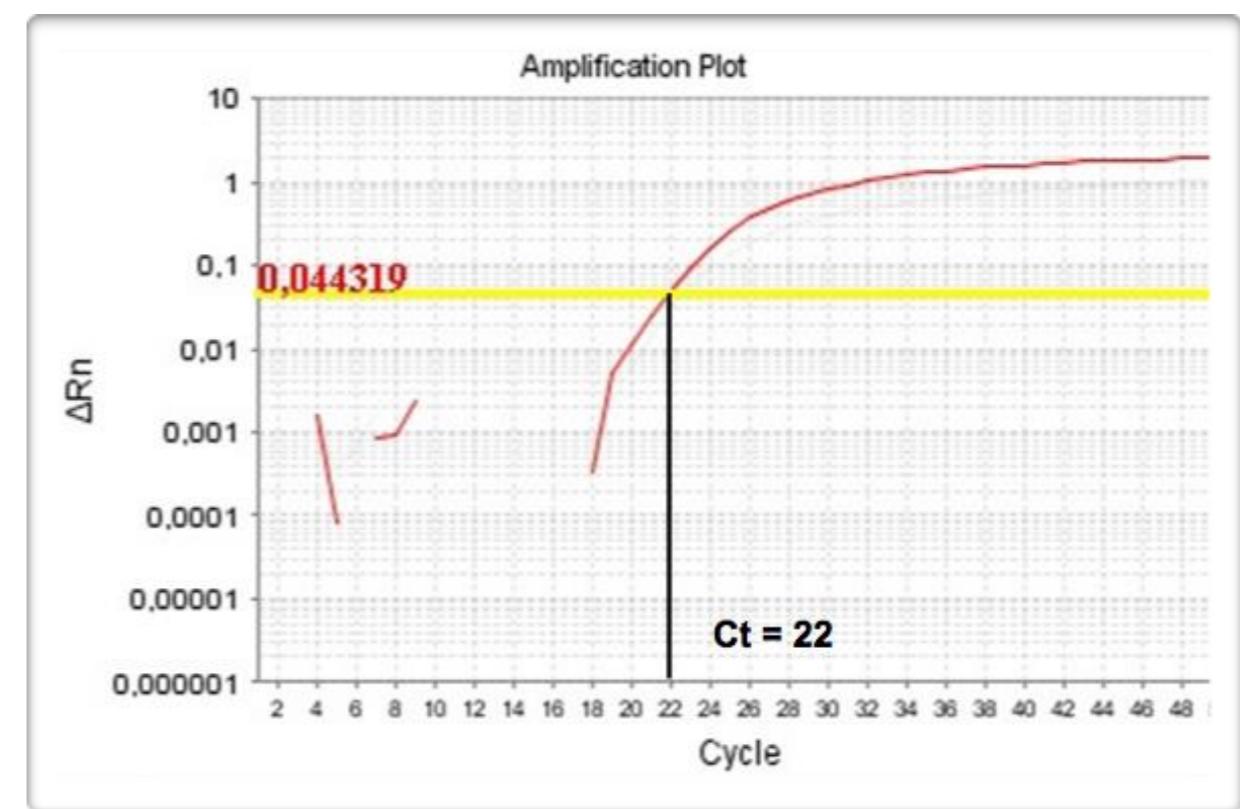
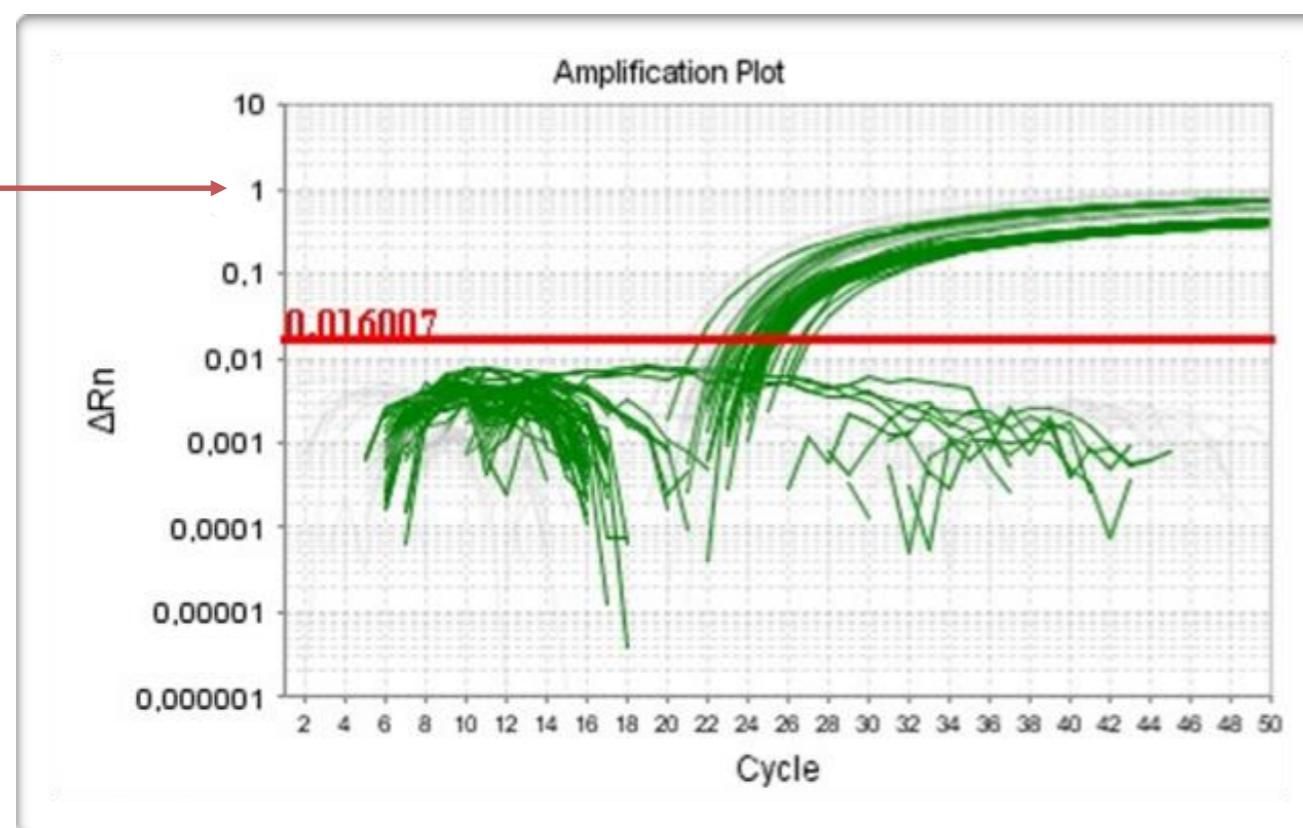
Dependente do tamanho do
fragmento

PCR tempo real

Sistema Taqman



PCR tempo real



PCR tempo real

Eficiência da reação é dependente de:

Preparo da reação (pipetagem)

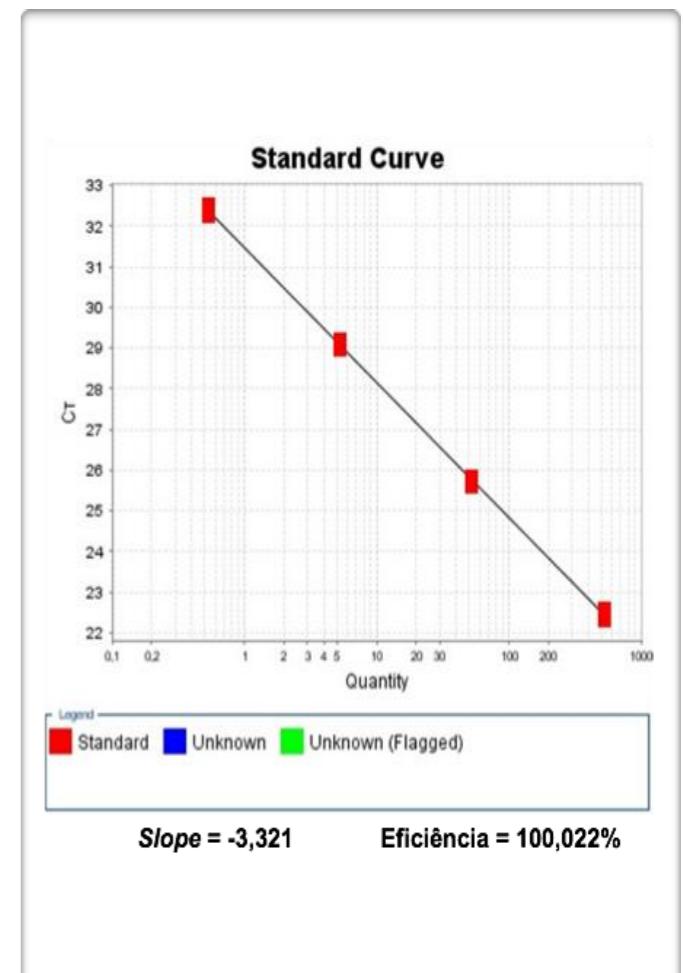
Qualidade do template (integridade do DNA/cDNA)

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

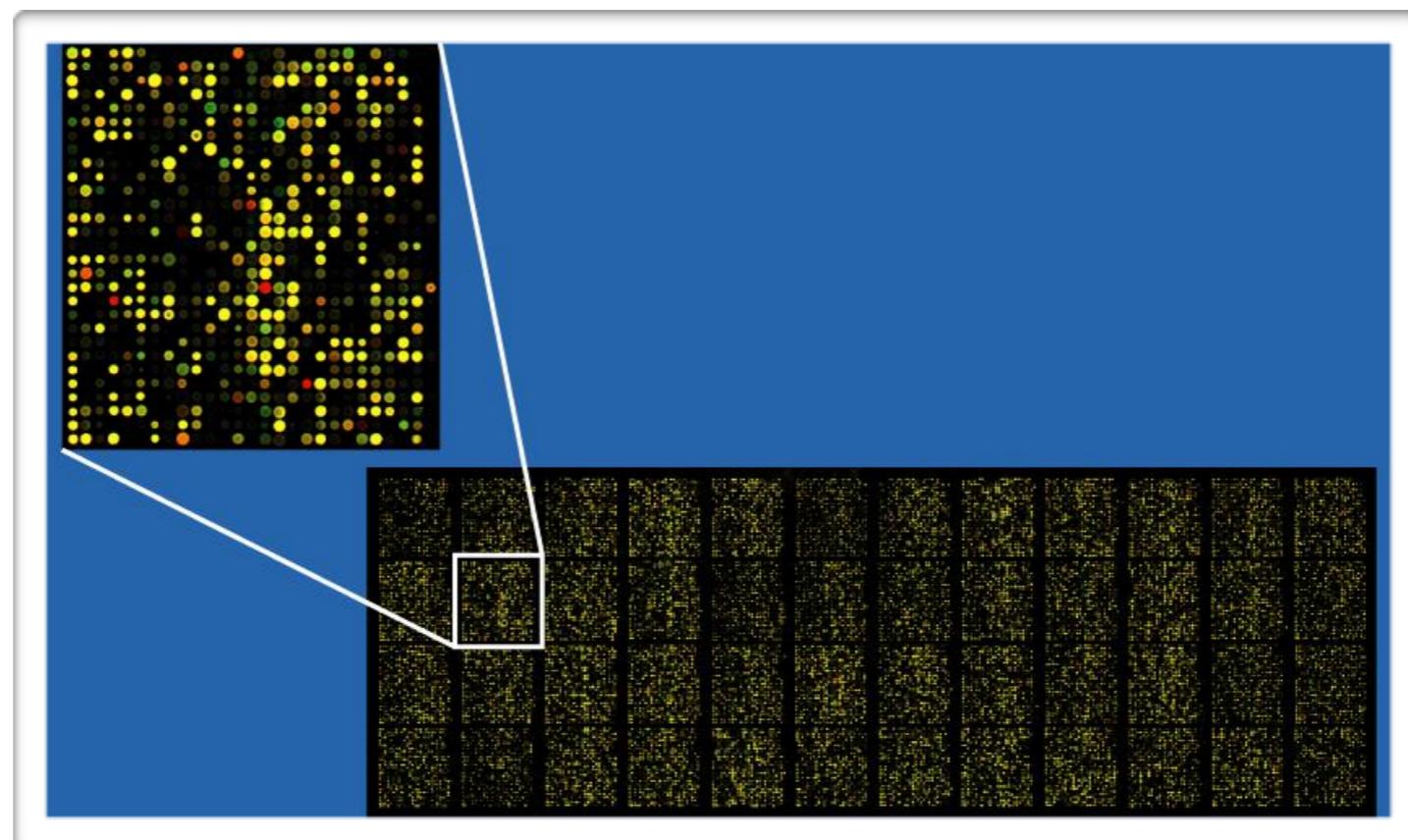
Desvantagens

Maior custo

Formação de dímeros e
hairpins de sondas e primers

Microarray

Lâminas de microscopia com *spots* minúsculos



Microarray

Aplicações:

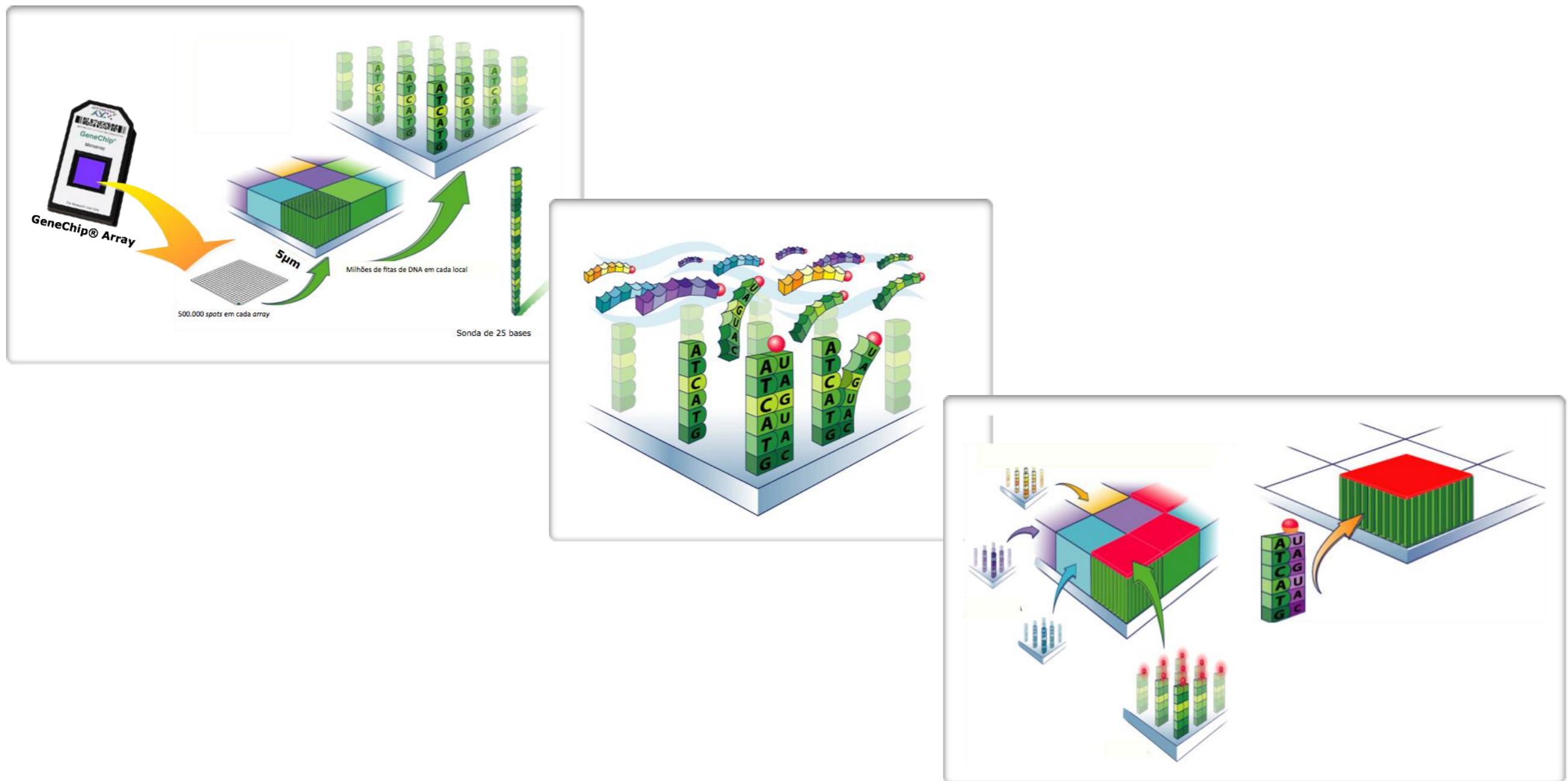
Perfil de expressão gênica (transcriptoma)

Genotipagem de polimorfismos em larga escala

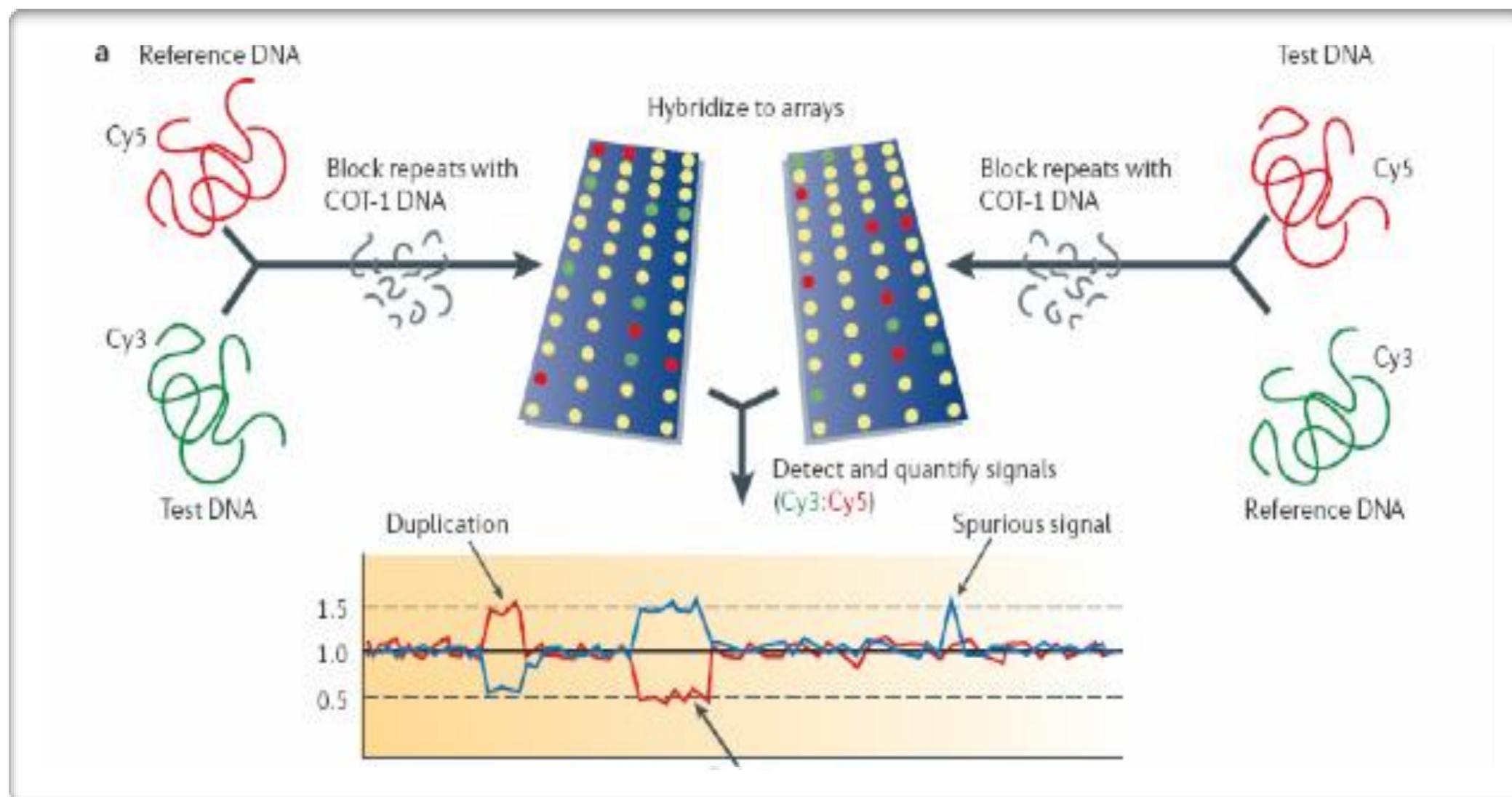
Alterações genômicas estruturais

Investigação de variações do número de cópias (CNVs)

Microarray



CGHarray



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

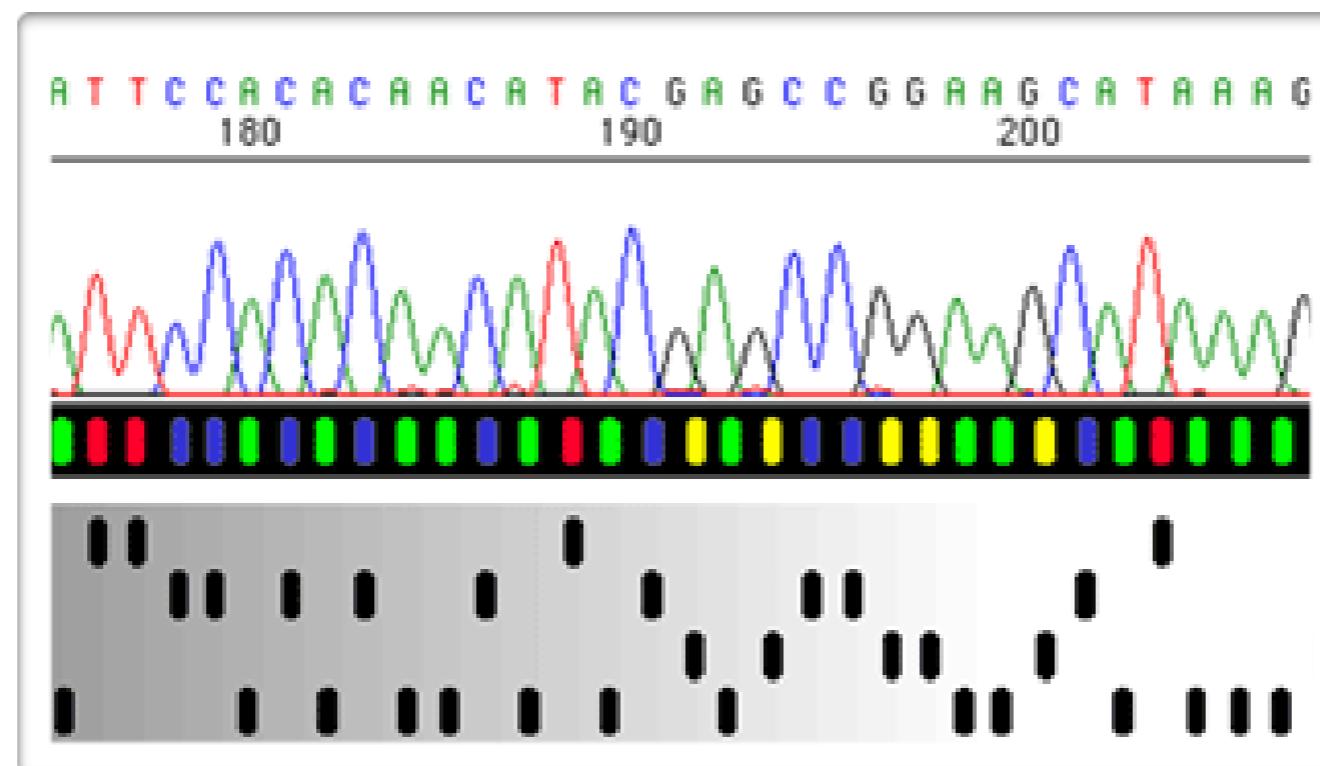
Limitado às sequências gênicas colocadas no suporte

Necessidade de validação em muitos casos

Necessidade de domínio para análise completa dos resultados

Plataforma para rodar experimentos é cara

Sequenciamento de Sanger

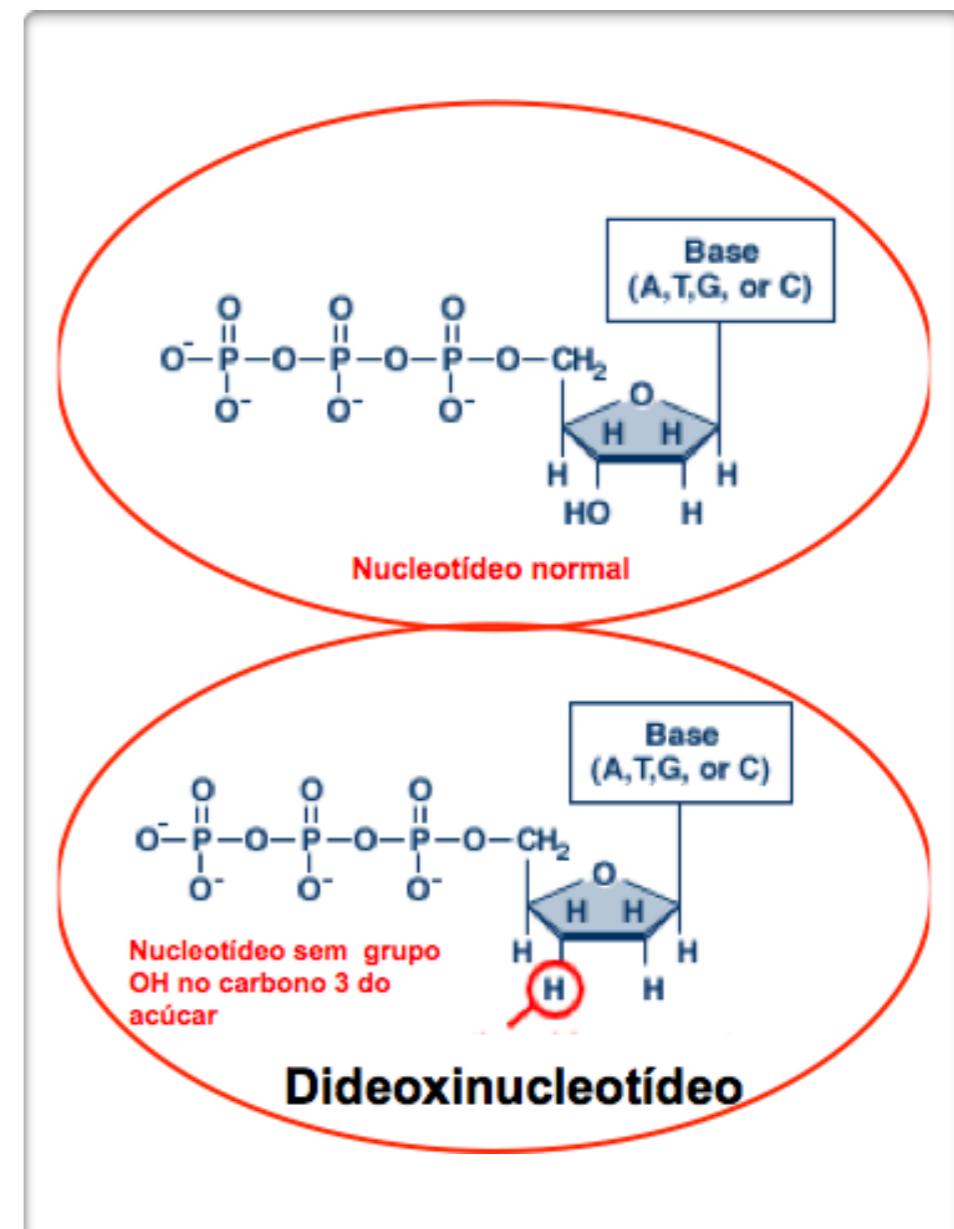


Sequenciamento de Sanger

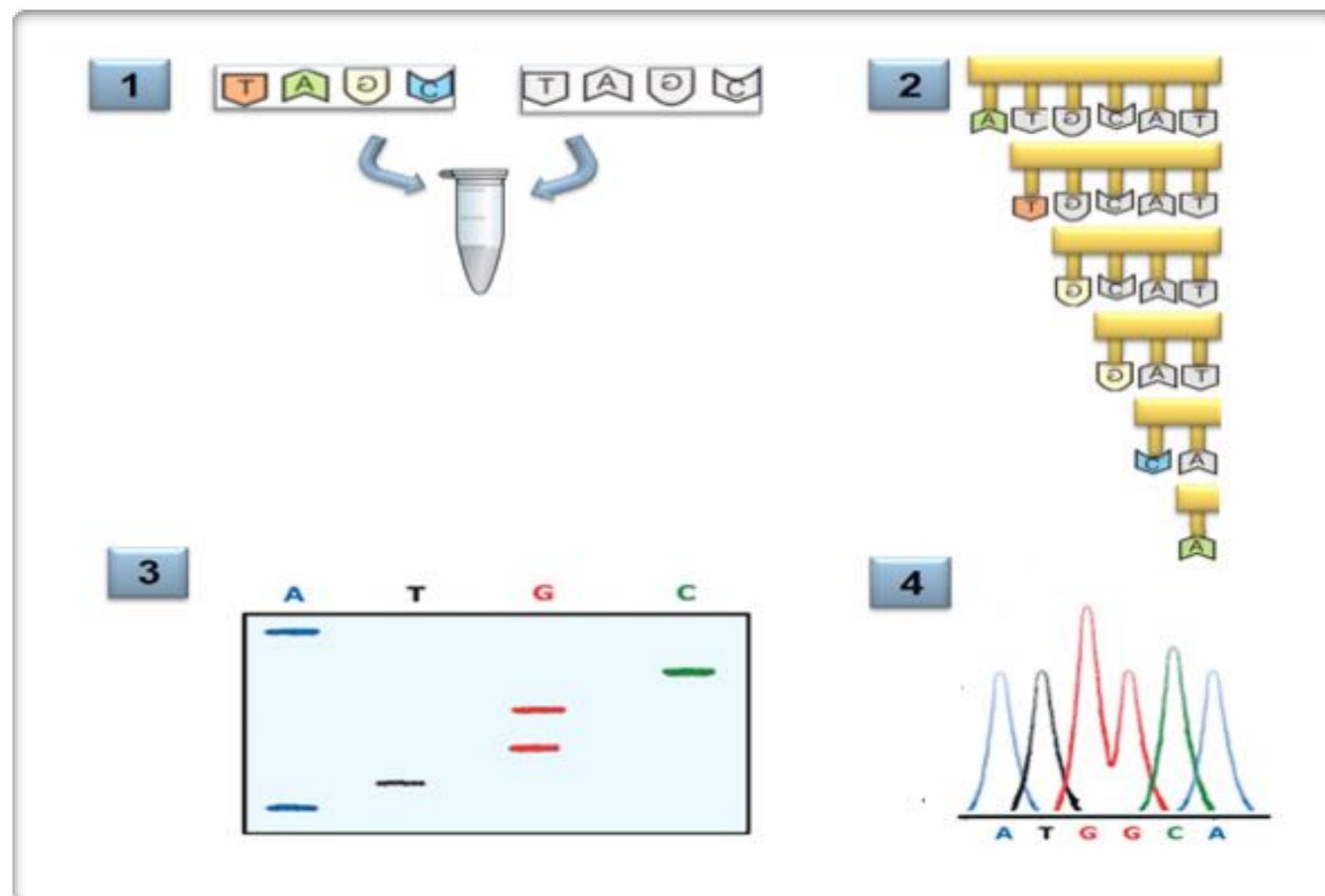
Este método baseia-se na adição de nucleotídeos modificados, chamados dideoxinucleotídeos

Estes nucleotídeos modificados não contém o grupamento 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

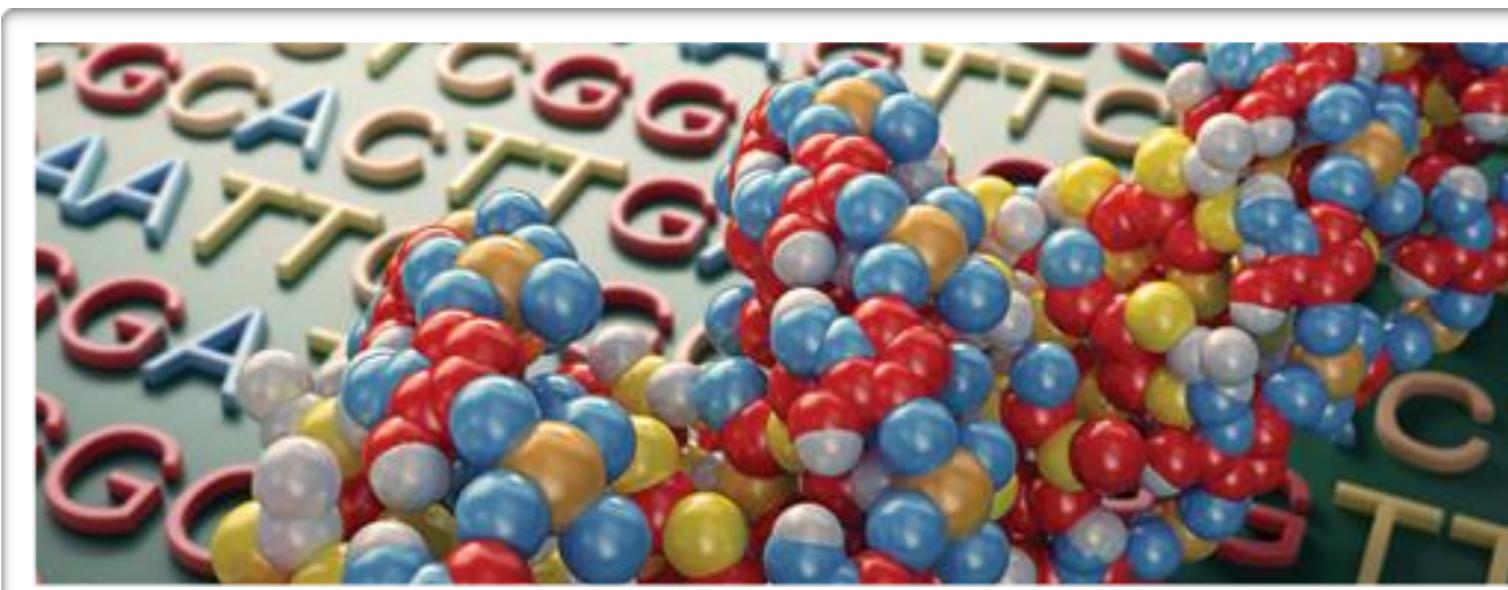
Vantagens

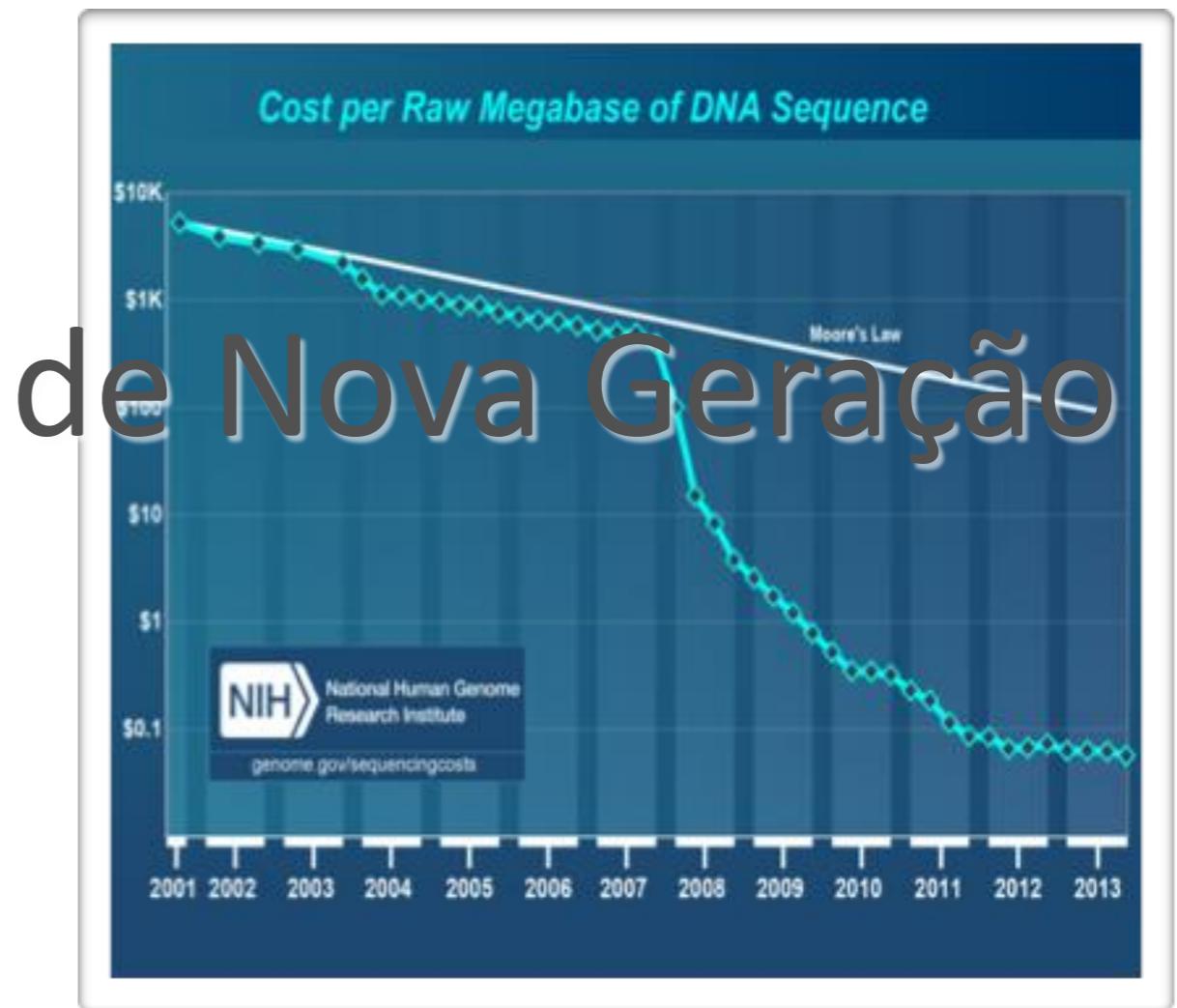
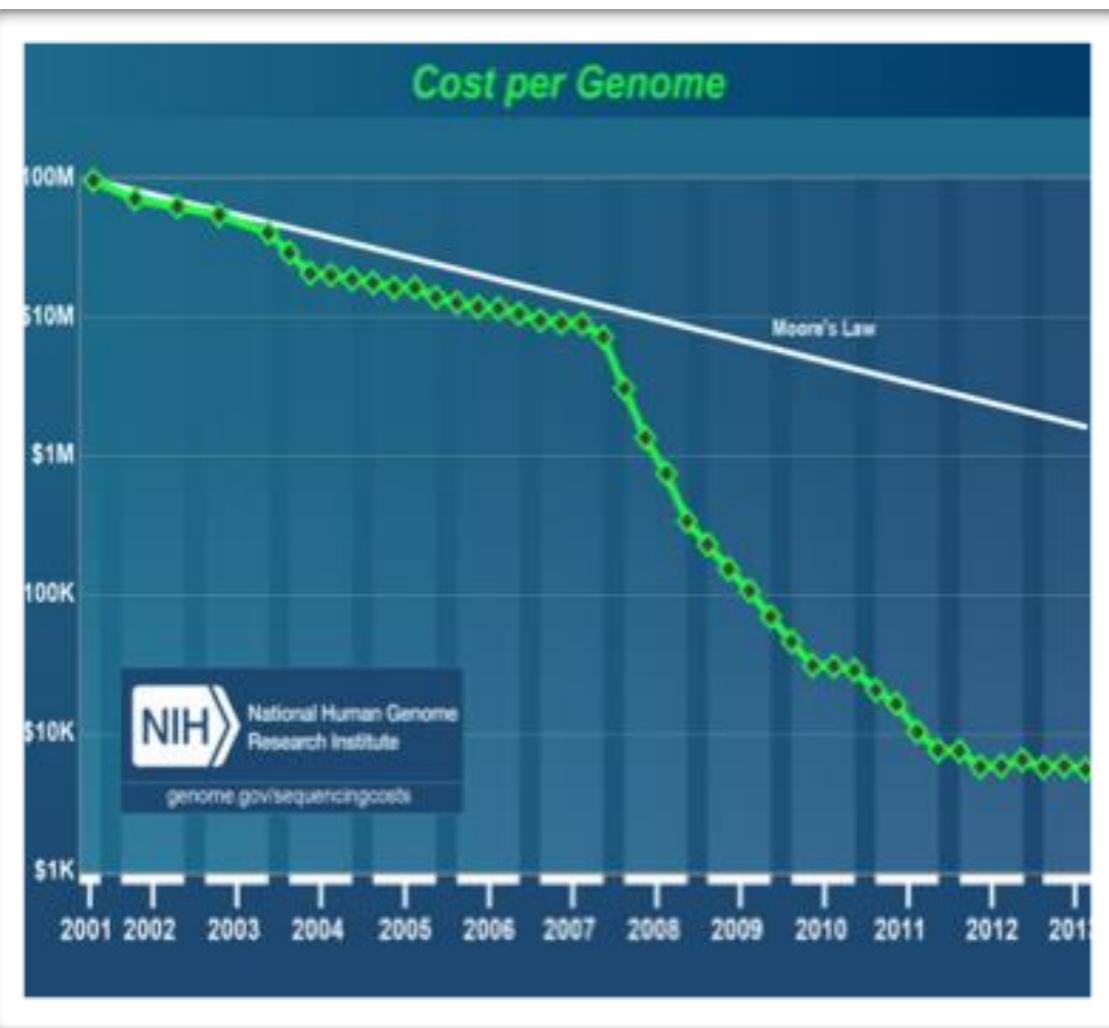
- pequena taxa de erro sistemático
- é mais barata por base sequenciada mas ainda é mais cara por corrida. (esperar uma placa ser preenchida)

Desvantagens

- Só para sequências pequenas

Sequenciamento de Nova Geração





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

Sequenciamento de Nova Geração

3 estágios:

Preparo da biblioteca de DNA
Geração automática de clusters de clones
Sequenciamento

Sequenciamento de Nova Geração

Vantagens

Alta escala

Quantitativa

Desvantagens

Estocagem (larga escala)

Montagem

Análise

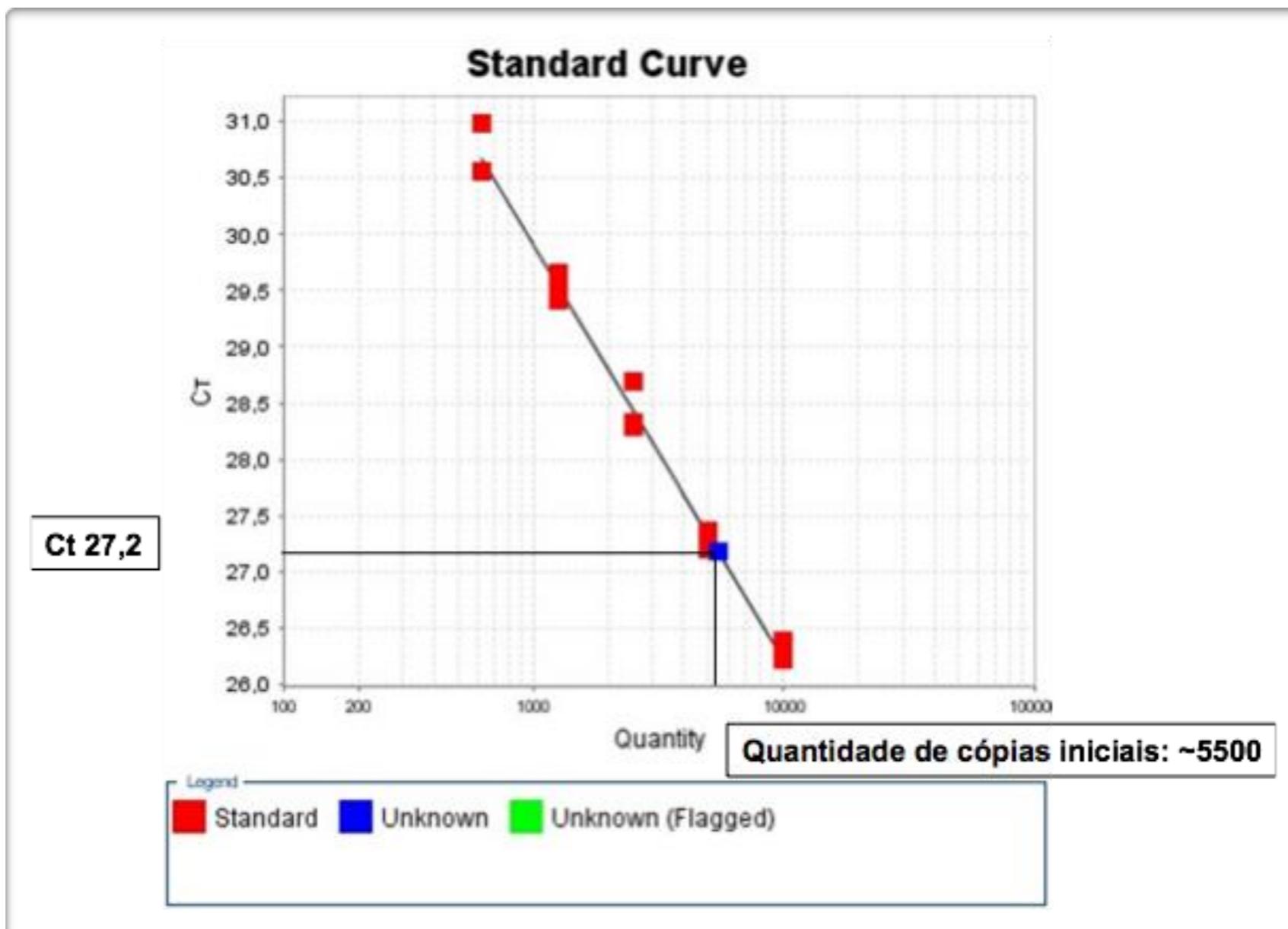




GENÉTICA

Funciona BASICAMENTE dessa forma

Curva de quantificação absoluta



Curva padrão relativa

