



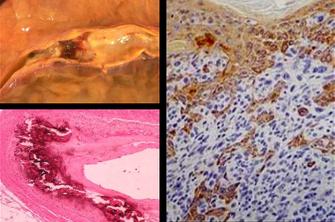
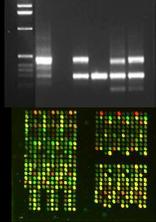
PCR

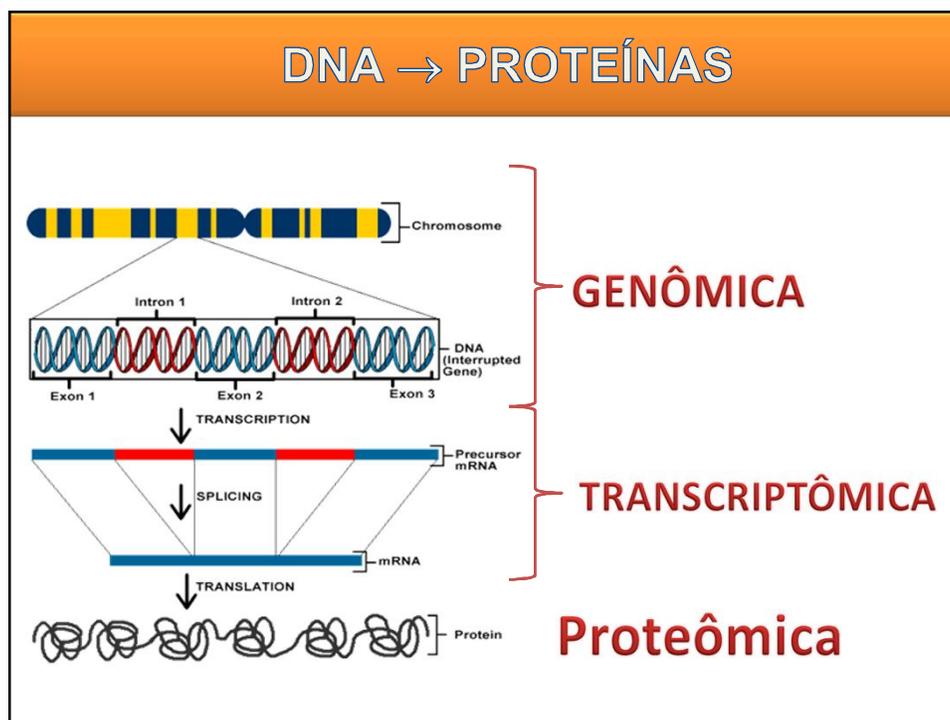
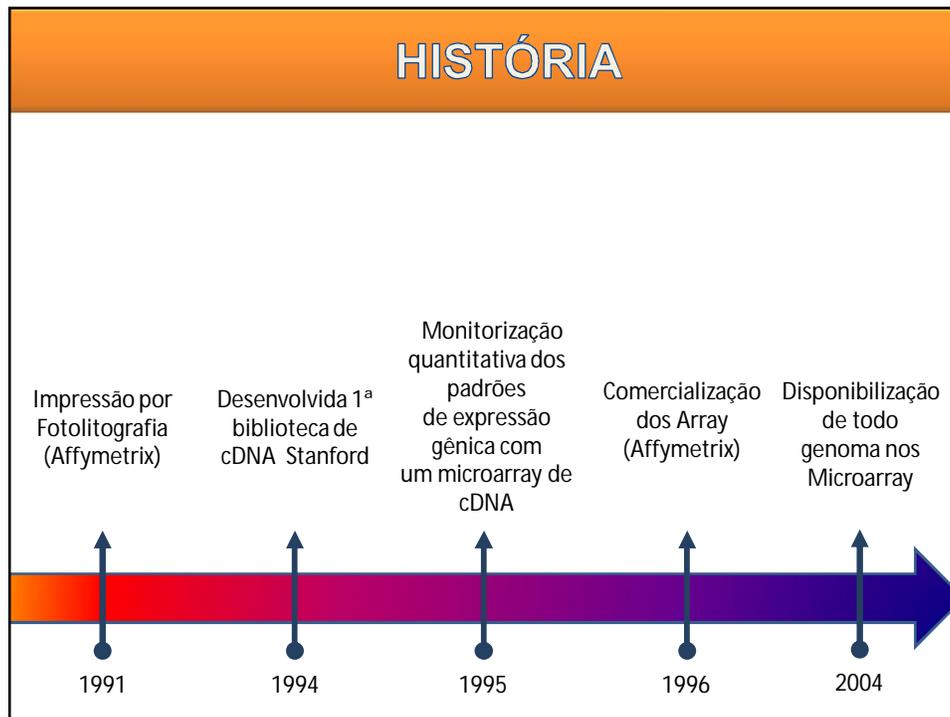
Prof. Dr. Ricardo Borra

Genes e Proteínas: Estudo em larga escala

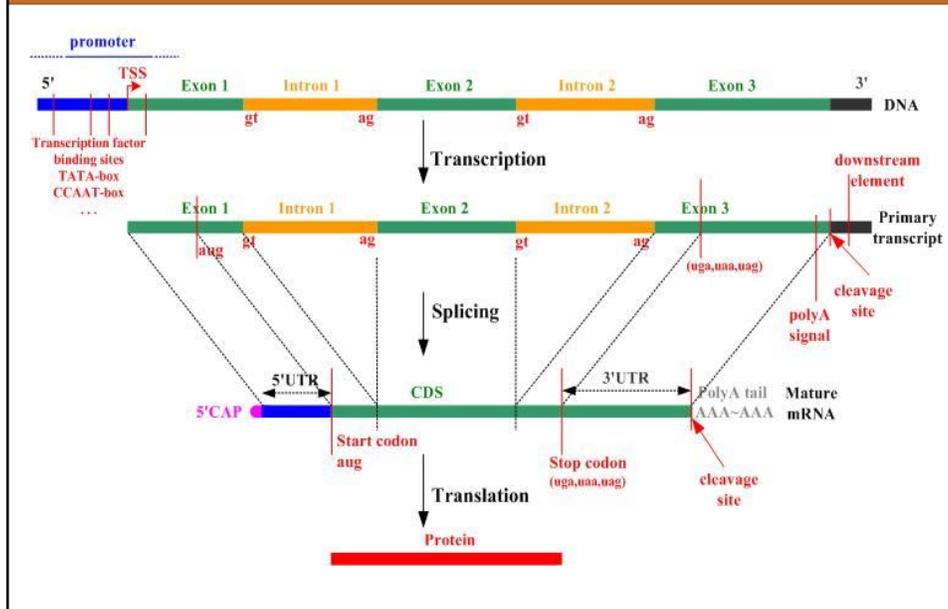
ETIOPATOGENIA DAS DOENÇAS

- Teoria mística: causa sobrenatural
- Teoria ambiental: alterações ambiente no meio físico
- Teoria dos miasmas: gases
- Teoria uni-causalidade (*Louis Paster*): agentes etiológicos
- Teoria multi-causalidade: agentes etiológicos + epidemiológicos

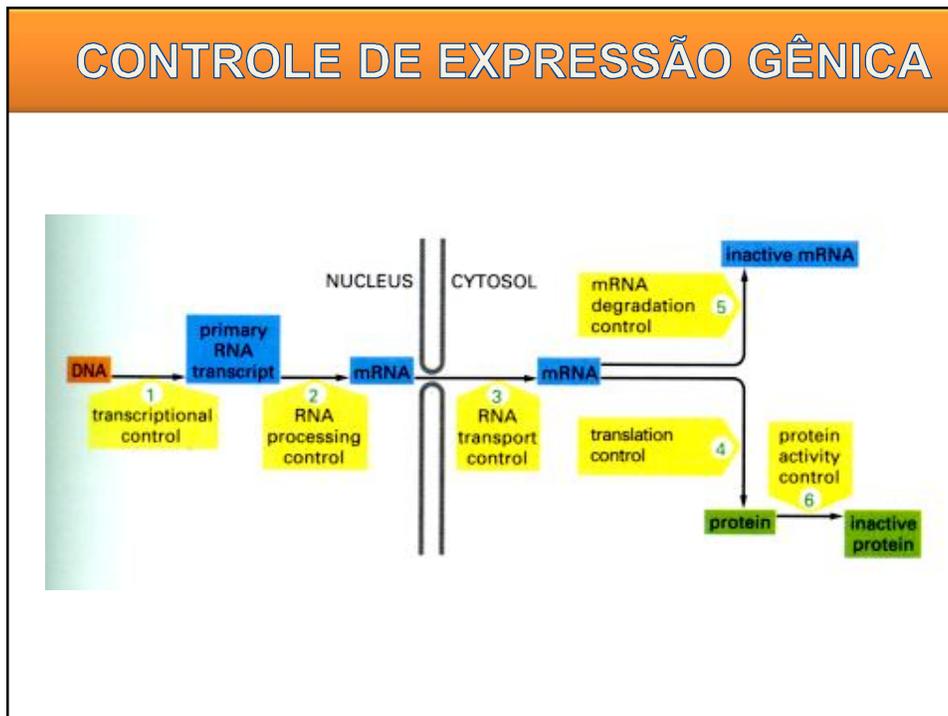
Macroscópico	Microscópico	Bioquímico	Molecular
Órgãos	Tecidos, Células, Organelas	Proteínas	DNA, RNA
			



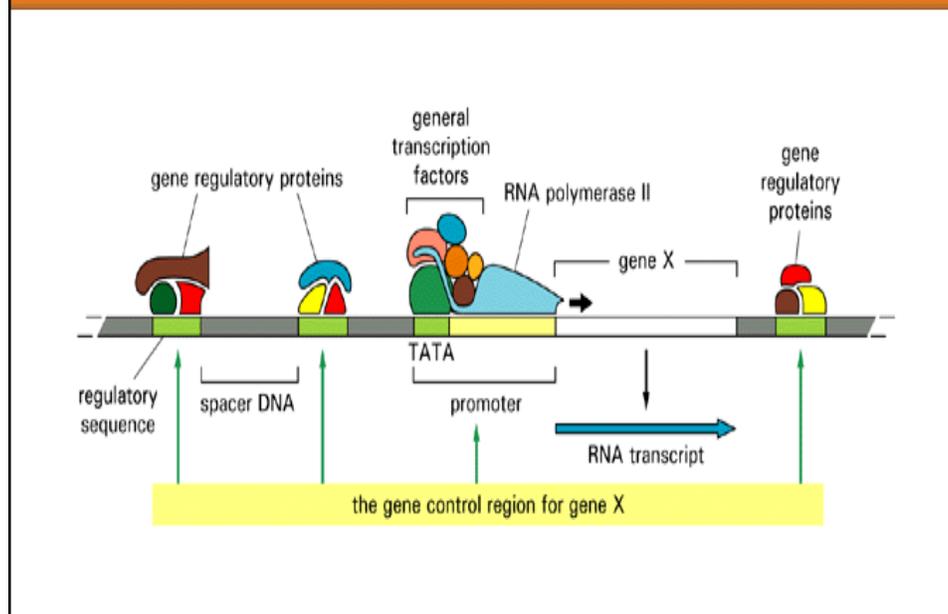
ESTRUTURA DO GENE



CONTROLE DE EXPRESSÃO GÊNICA



CONTROLE DE EXPRESSÃO GÊNICA



TRANSCRIPTOMA

O CONHECIMENTO DA ESTRUTURA DE UM GENE OU DE OUTRO ELEMENTO FUNCIONAL É SOMENTE PARTE DA RESPOSTA QUE PRECISAMOS;

❖ A necessidade vai mais além → está na elucidação da função dos genes e isso resultará da comparação de dados, como **interação de genomas com o ambiente ou níveis de expressão gênica com o desenvolvimento normal e patológico;**

❖ Por analogia com o termo genoma, que representa o conjunto completo dos genes (DNA) de um organismo, criou-se o termo **TRANSCRIPTOMA**, que representa o estudo das características e regulação do conjunto completo dos transcritos (RNAs) de uma células, tecido ou organismos;

TRANSCRIPTOMA

- ❖ Célula de mamífero típica → 300.000 moléculas individuais de RNAs mensageiros;
- ❖ Dentro da análise dos transcriptomas, o primeiro recurso disponível foram as bibliotecas de DNAs complementares (cDNA);
- ❖ Atualmente, uma das últimas palavras em tecnologia para o estudo dos transcriptomas são os DNA-arrays (assinaturas de hibridação);
- ❖ O poder dos métodos = milhares de níveis de expressão podem ser mensurados num único experimento;

- ❖ 35, 913 transcritos (incluindo os *splicing* alternativos)
- ❖ RNAs não codificantes
 - ❖ tRNAs (497 genes)
 - ❖ rRNAs (243 genes)
 - ❖ snmRNAs (pequenos RNAs não mensageiros)
 - ❖ microRNAs and siRNAs (pequenos RNAs de interferência)
 - ❖ snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares)
 - ❖ snRNAs (pequenos RNAs nucleares)
 - ❖ Pseudogenes (~ 2,000)

TRANSCRIPTOMA

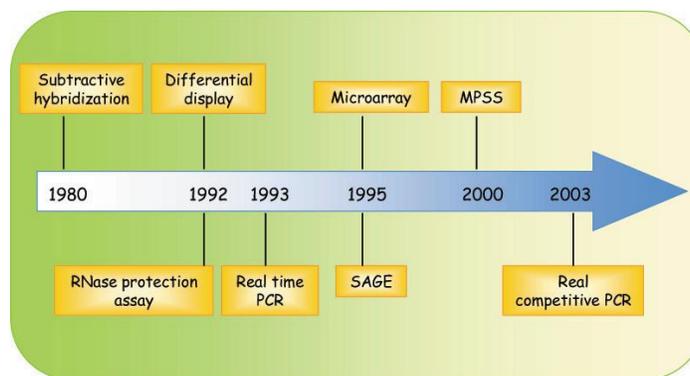
AA *Análise de Larga Escala*

SSistemas fechados de padrão de expressão:

- ❖ **MMicroarray expression profiling**

SSistemas abertos de padrão de expressão:

- ❖ **SSerial analysis of gene expression (SAGE)**
- ❖ **MMassively Parallel Signature Sequencing (MPSS)**



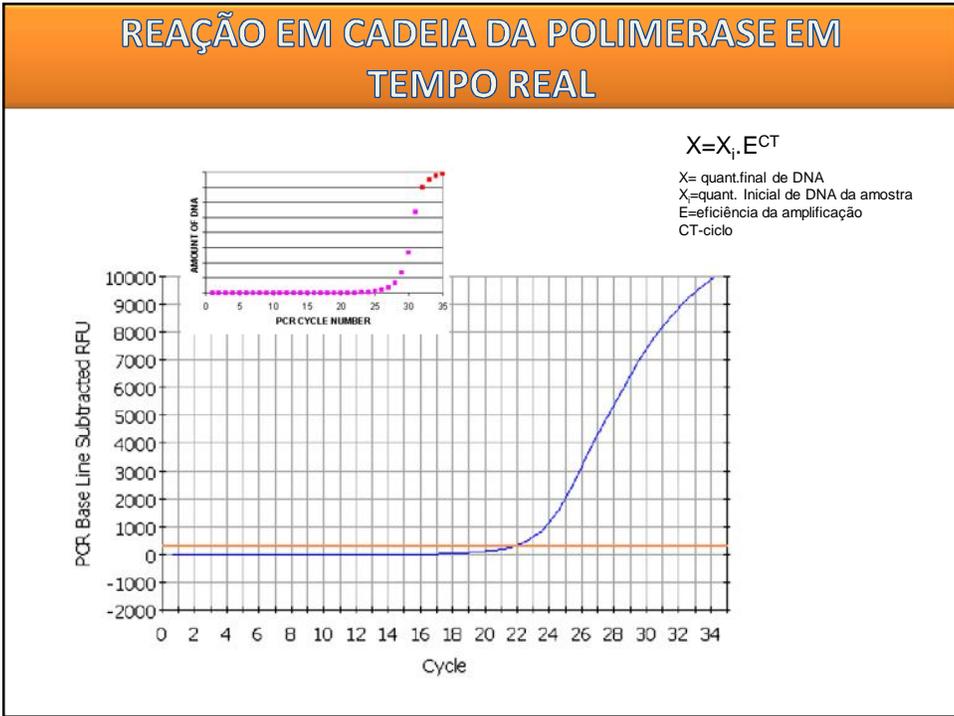
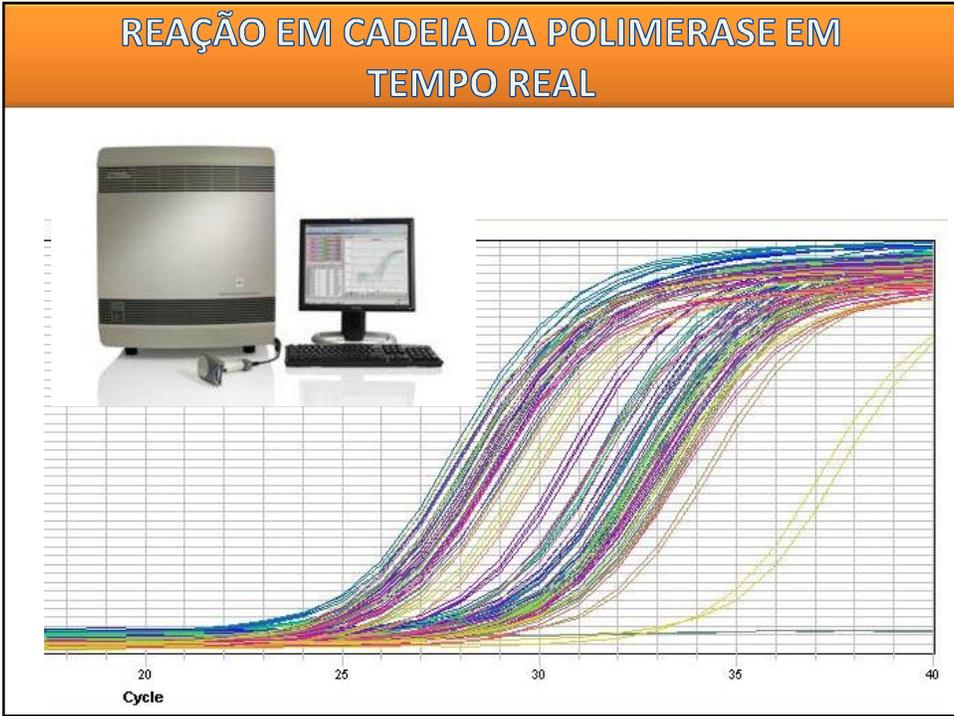
REAL TIME PCR

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

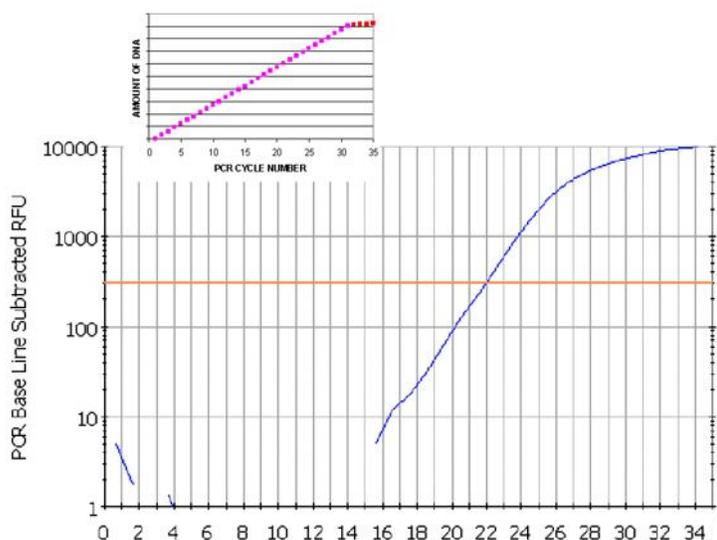
MÉTODO TAQMAN

TaqMan® Probe Method

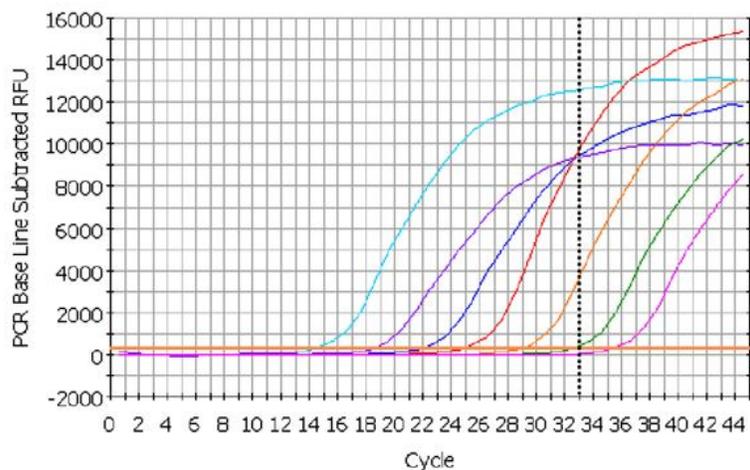
MÉTODO SYBRGREEN



REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

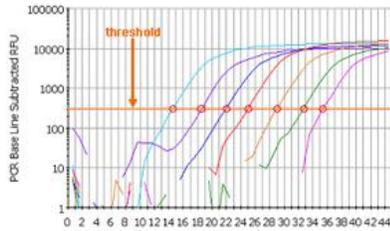


REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL



SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS

REACÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

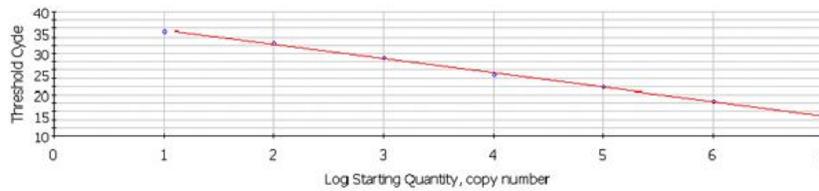


Cálculo da eficiência da reação

$$E = 10^{(1/\text{slope})}$$

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

Unknowns Standards

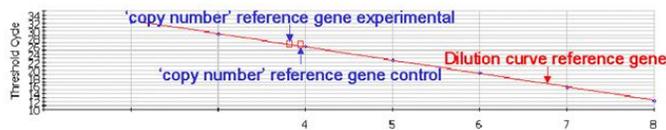


PCR Standard Curve: Data 27-Jan-03 1233ileff.opd

REACÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

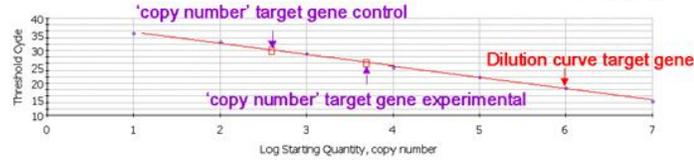
Correlation Coefficient: 1.000 Slope: -3.360 Intercept: 39.319 $Y = -3.360 X + 39.319$

Unknowns Standards

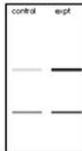


Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.488 Intercept: 39.204 $Y = -3.488 X + 39.204$

Unknowns Standards



NORTHERN

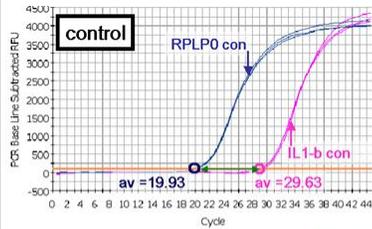


Ratio experimental:control = $\frac{\text{fold change in target gene}}{\text{fold change in reference gene}}$

$$\text{fold change in target gene} = \frac{\text{copy number experimental}}{\text{copy number control}}$$

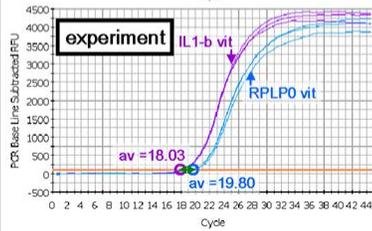
$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref (control-treated)}}$$

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL



$$\Delta Ct = \text{target} - \text{ref}$$

$$\Delta Ct = 9.70$$



$$\Delta Ct = \text{target} - \text{ref}$$

$$\Delta Ct = -1.7$$

$$\text{Difference} = \Delta Ct - \Delta Ct$$

$$= \Delta \Delta Ct$$

$$= 9.70 - (-1.7)$$

$$= 11.40$$

$\Delta \Delta Ct = 11.40$ for IL1-beta

- If efficiency is 100% then
– Fold change = $2^{11.40} = 2702$

MUITO OBRIGADO