

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



Genética Molecular

Técnicas aplicadas a produção animal

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL

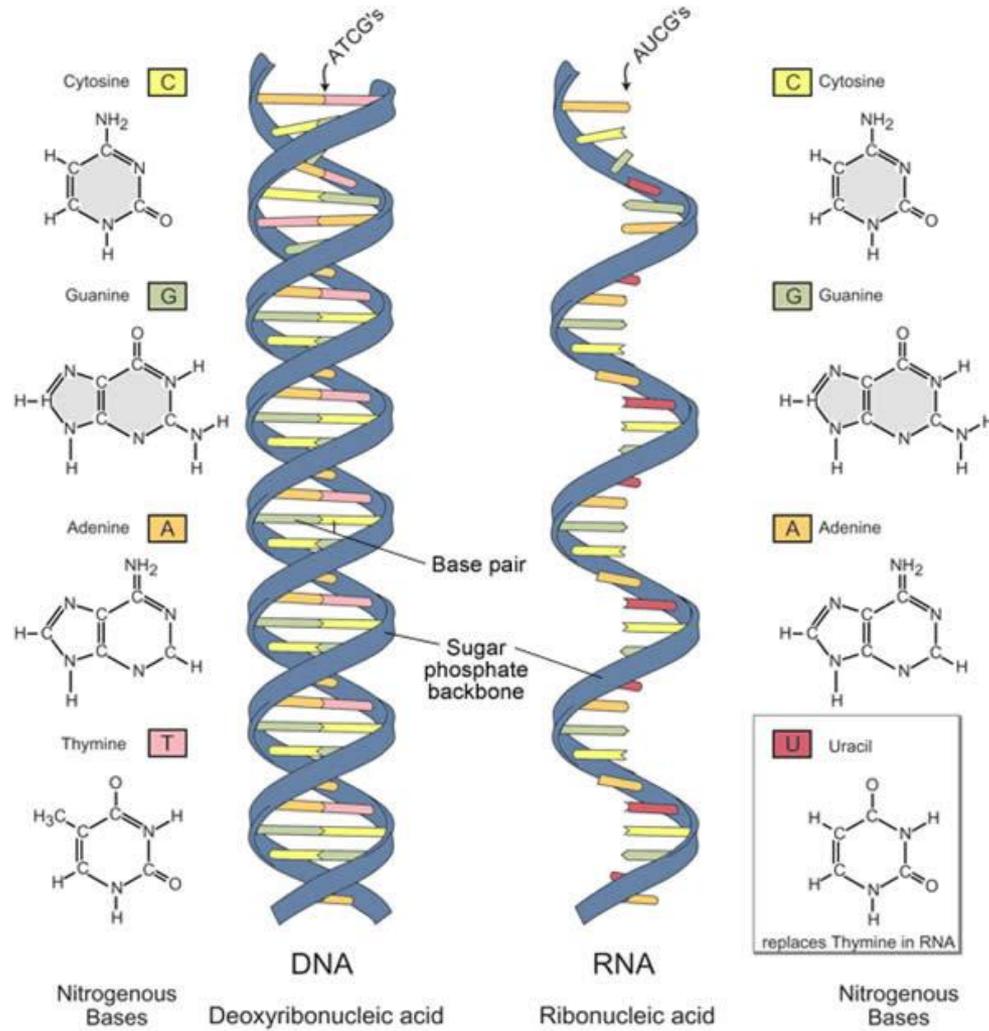
- ✓ Agropecuária vai passar por muito mais mudanças tudo por conta da Biotecnologia.



✓ Engenharia Genética

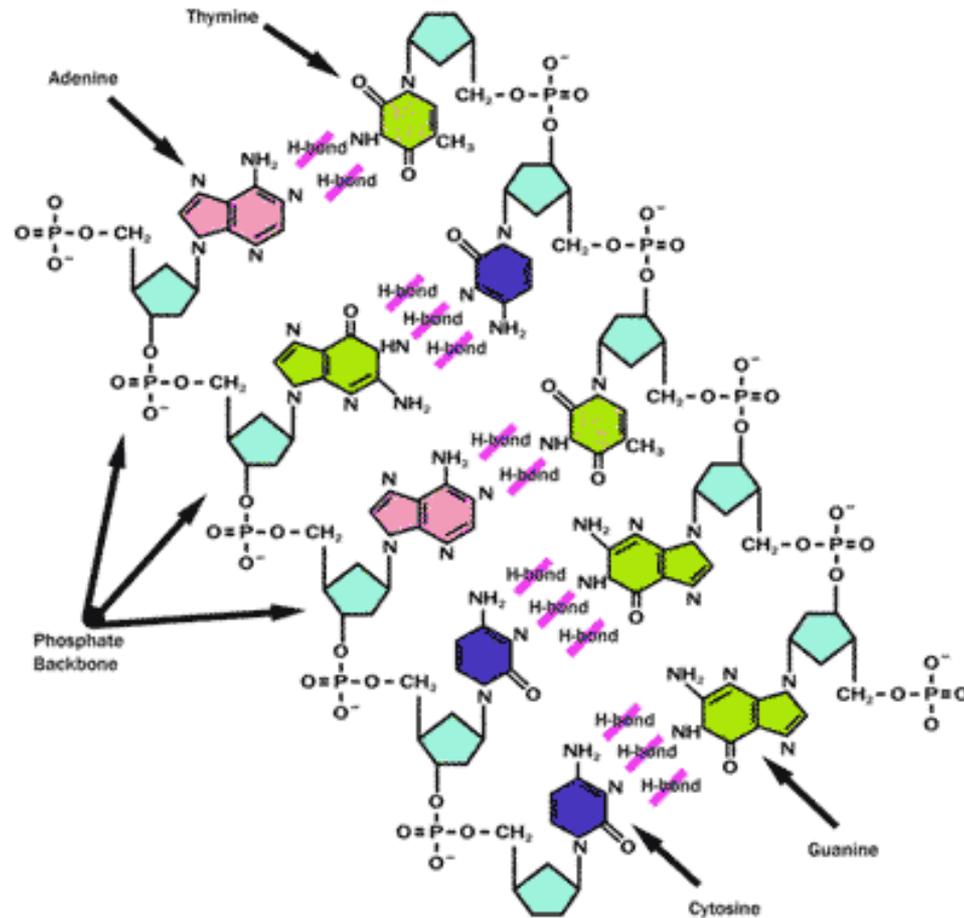


✓ DNA e RNA

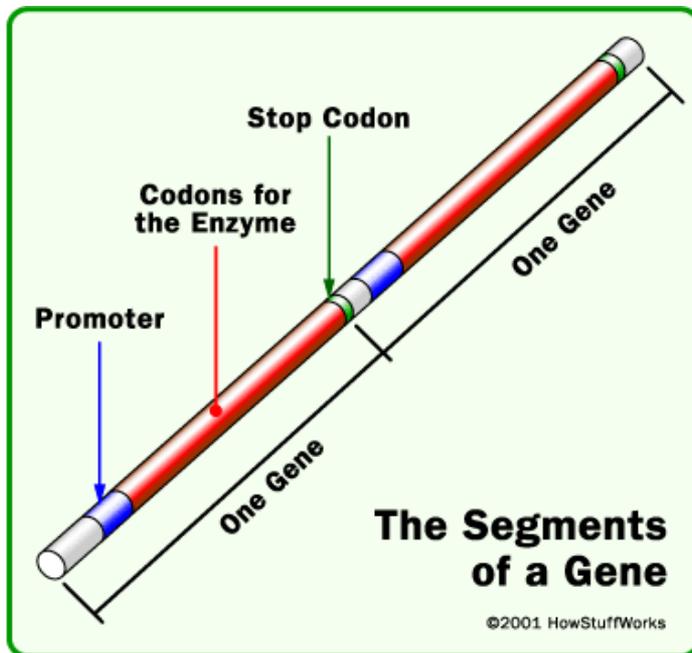
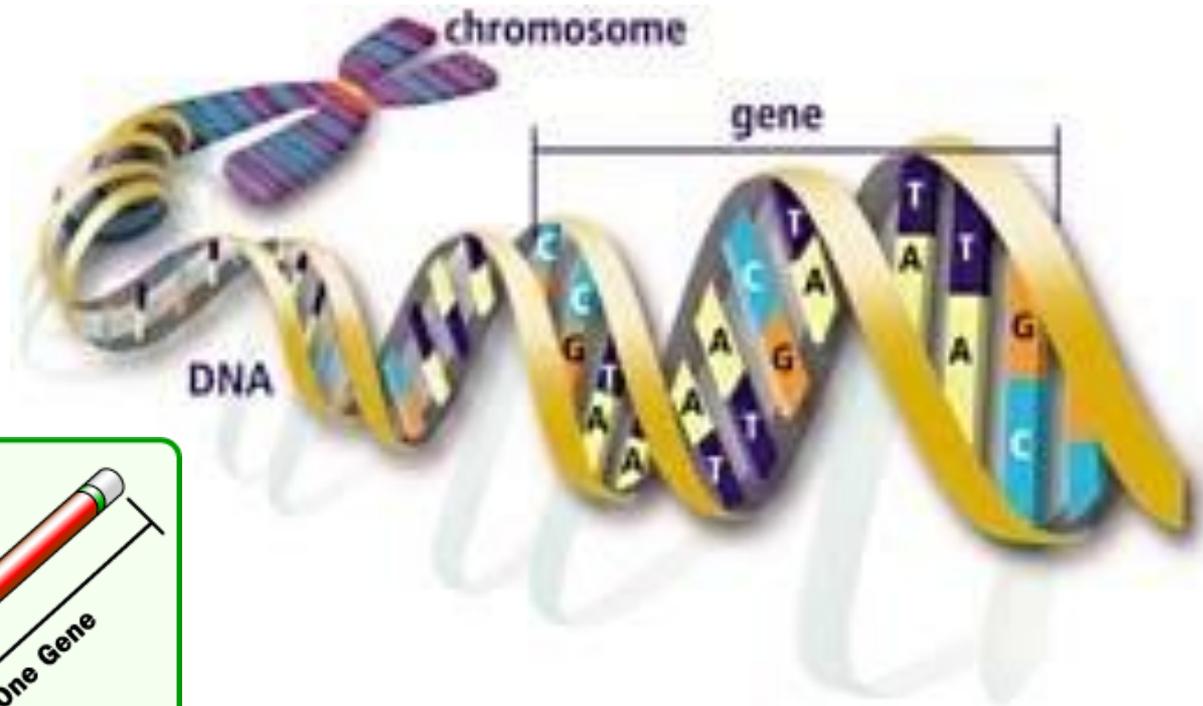


✓ DNA

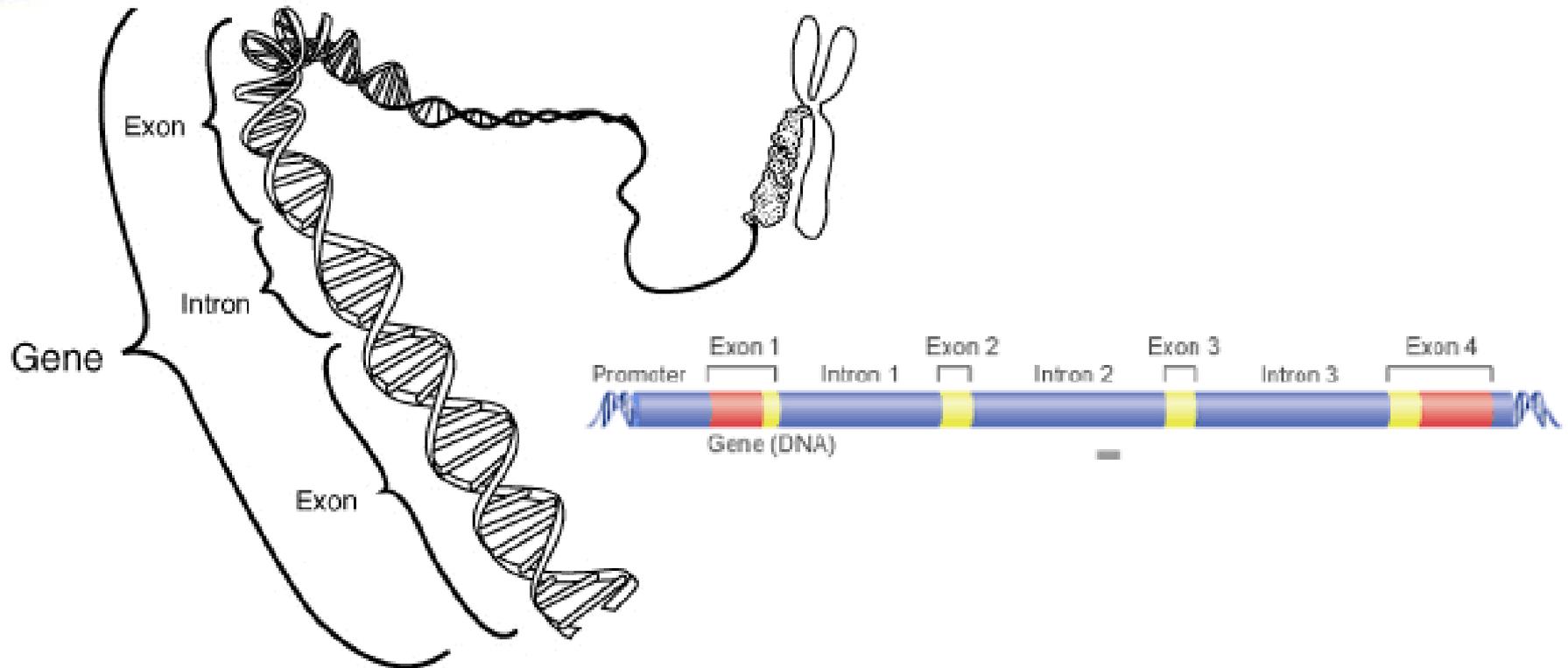
✓ 5' ----- 3'



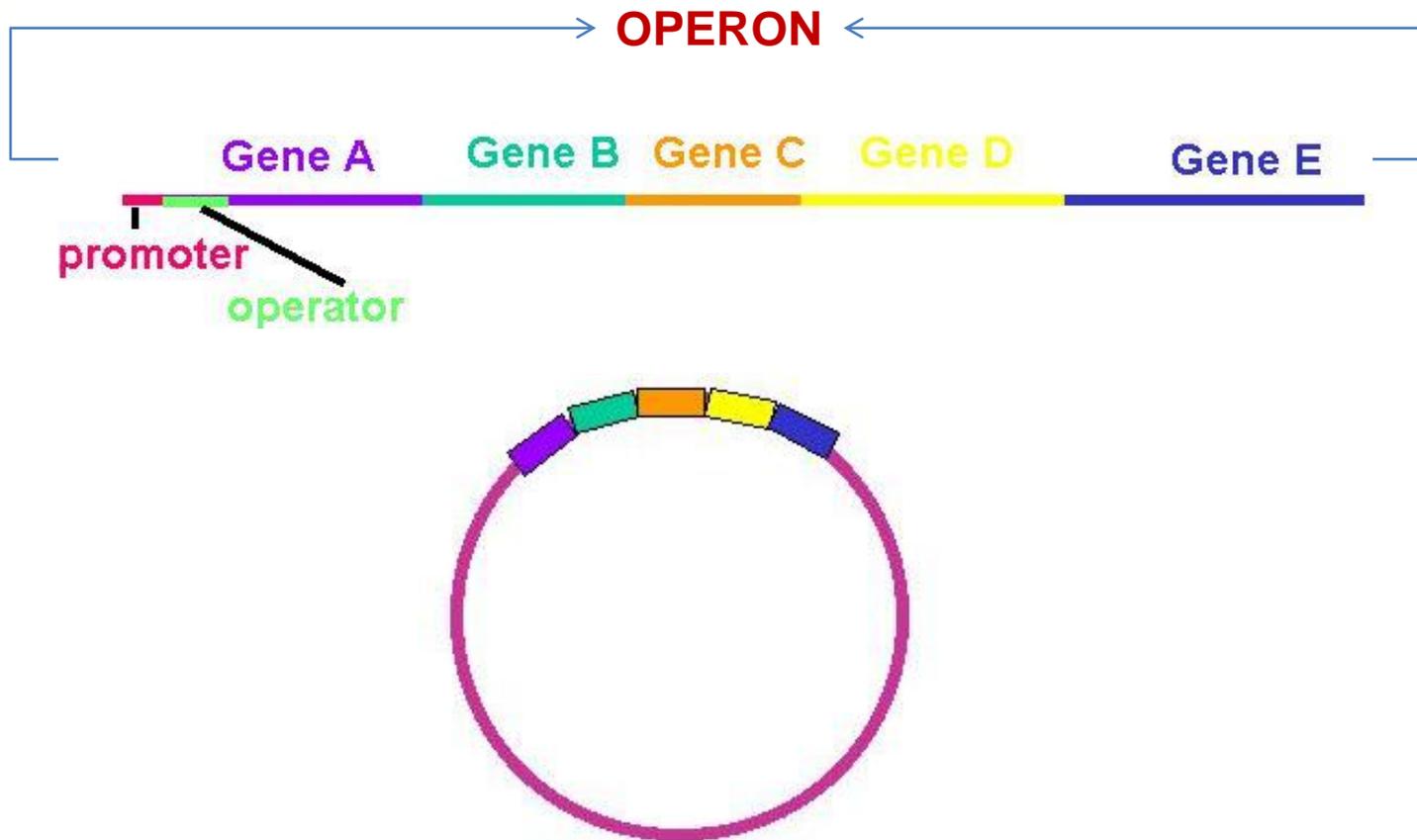
✓ Gene



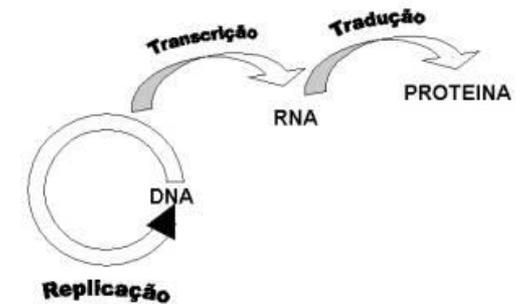
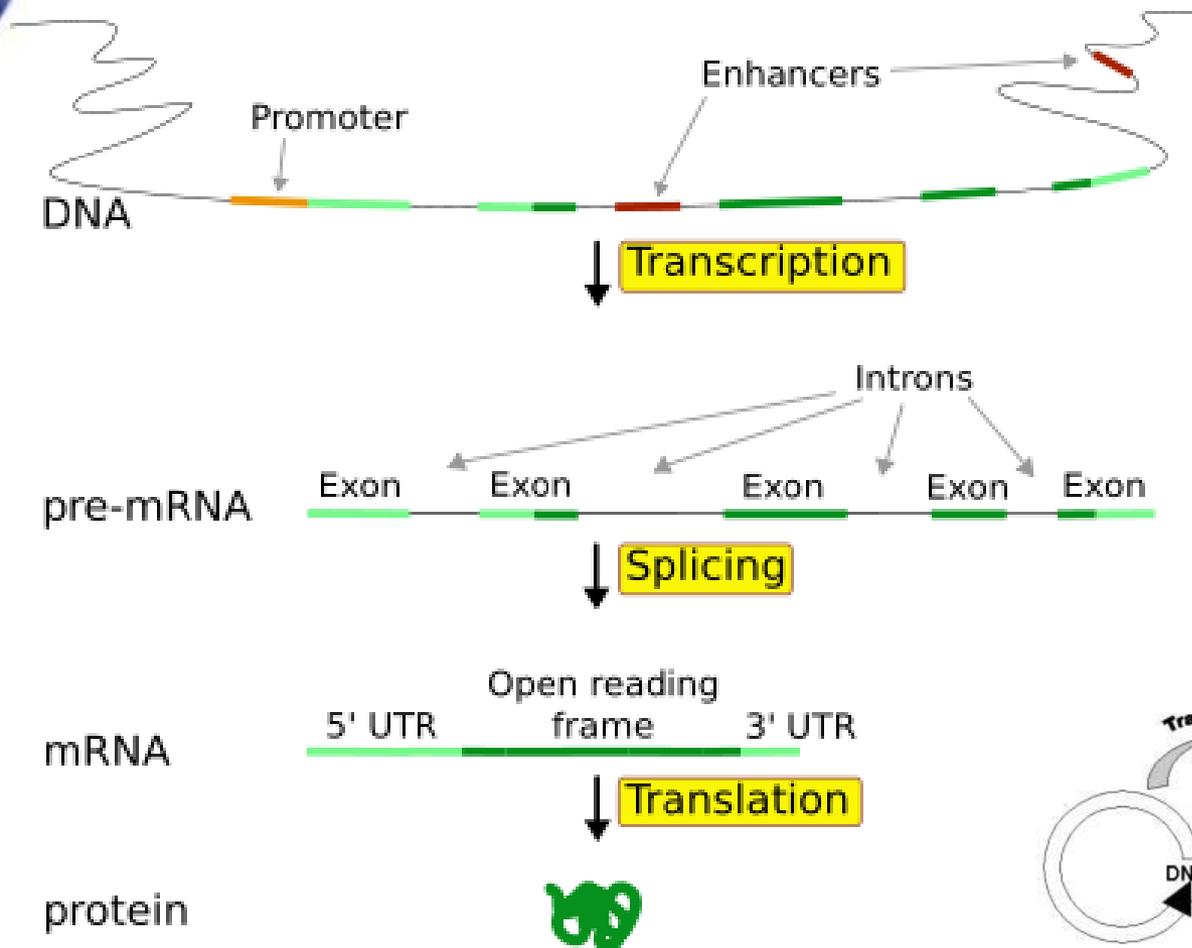
✓ Gene



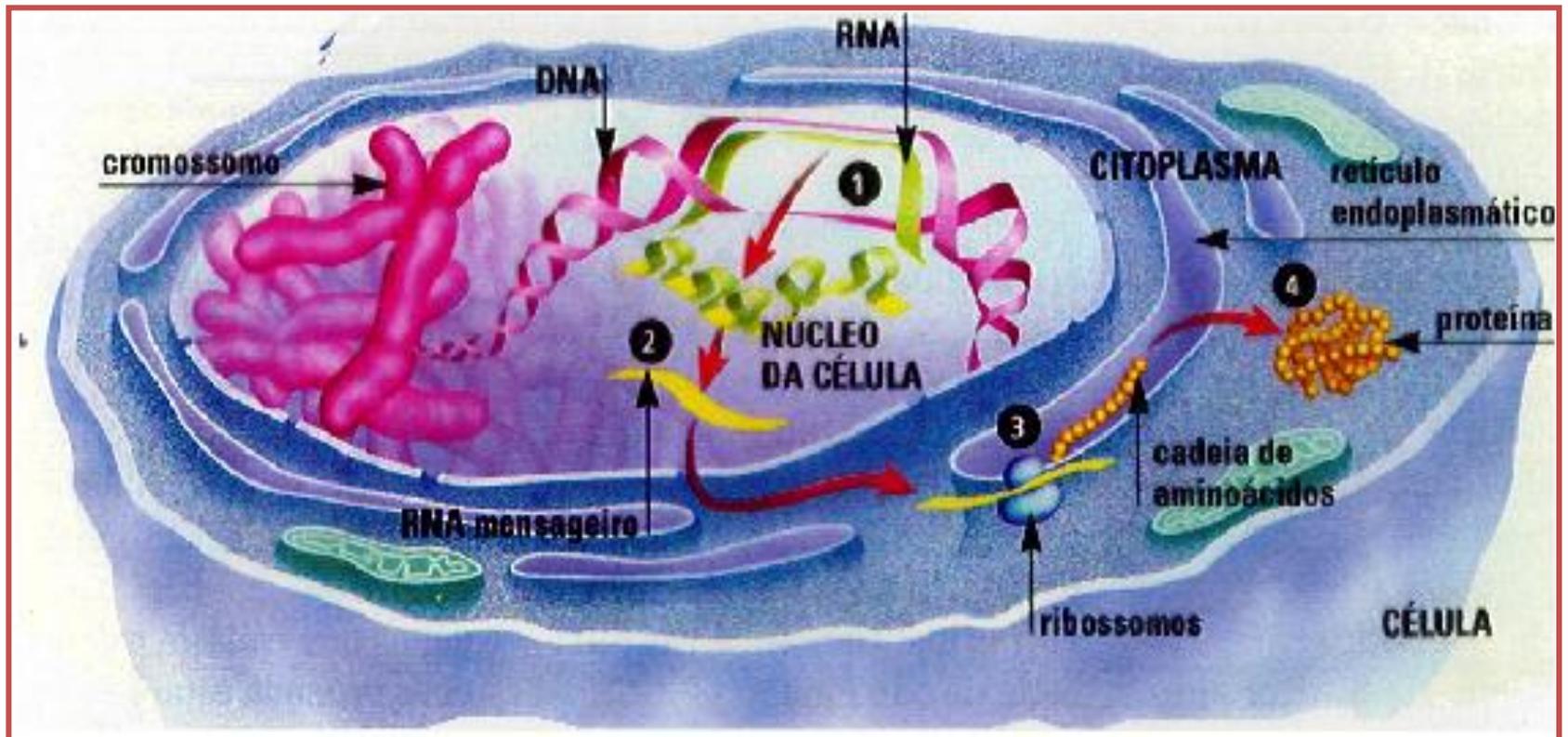
✓ Gene



✓ Síntese Protéica

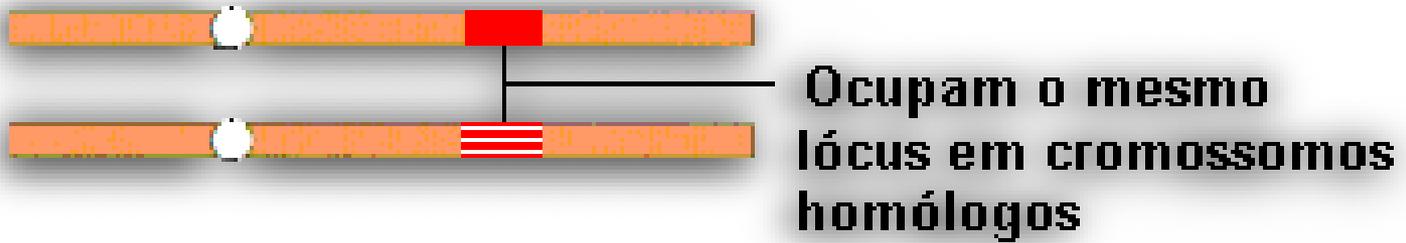


✓ Síntese Proteica



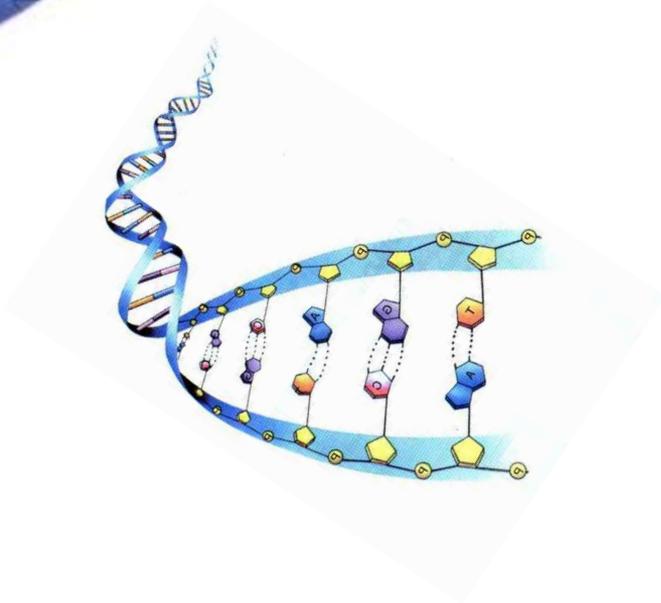
✓ Alelo

Genes Alelos



- Versões diferentes do mesmo **GENE**.

✓ Fenótipo



+



Interação Alélica e Gênica

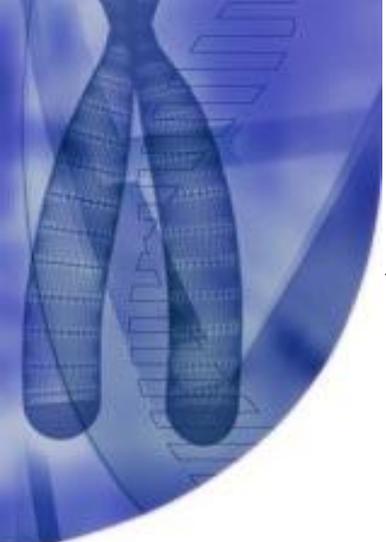
Ambiente

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



Clonagem Gênica (DNA Recombinante)

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL



✓ DNA Recombinante

✓ É uma molécula de DNA formada pela ligação de duas moléculas de origens diferentes.

✓ Enzimas de Restrição

✓ DNA Ligase

✓ Vetores de Clonagem

✓ Transformação

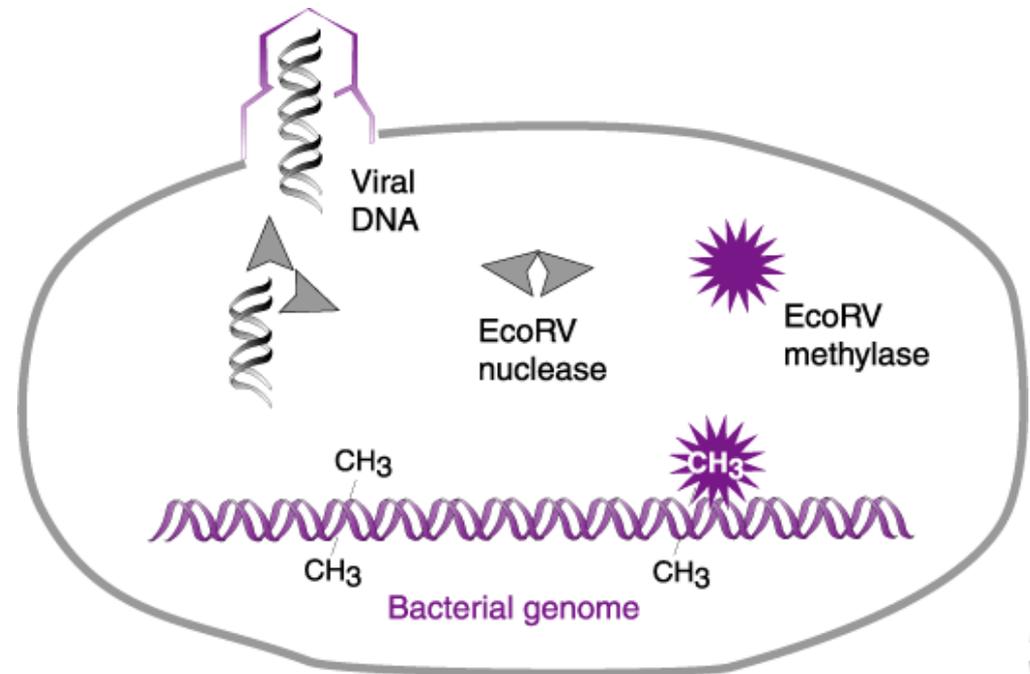
✓ Seleção

✓ Enzima de Restrição

✓ Cliva fita dupla de DNA sempre que identificar uma seqüência particular de nucleotídios que seja o sítio de restrição da enzima.

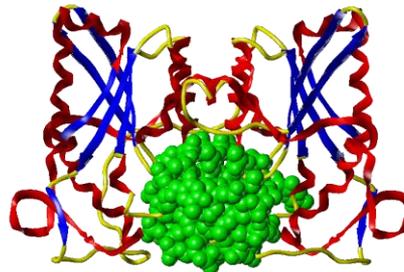
✓ *Função natural: proteger o DNA bacteriano do DNA exógeno*

✓ 1.200 enzimas de restrição – cliva-se sequencias de 4, 5 até 8 nucleotídeos



- ✓ Enzima de Restrição
 - ✓ Primeira Letra maiúscula= gênero
 - ✓ Segunda e terceira letras= espécie
 - ✓ Letra adicional= cepa da bactéria se não for tipo selvagem
 - ✓ Número em algarismo romano= número da enzima descoberta.

Ex.: a enzima *EcoRI* foi descoberta em *Escherichia coli*, cêpaRY13, e foi a primeira enzima de restrição identificada naquela espécie(por isto a designação I).



*Bam*HI

✓ Enzima de Restrição

✓ *Bam*HI - *Bacillus amyloliquefaciens* H
5' G/GATCC 3'

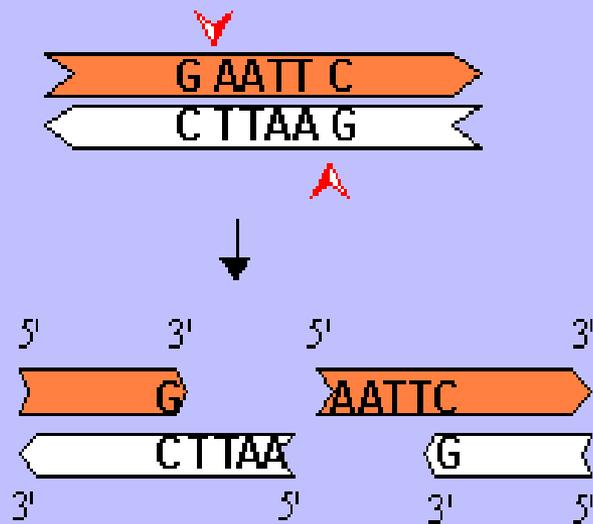
✓ *Eco*RI - *Escherichia coli* R
5' G/AATTC 3'

✓ *Hae*III - *Haemophilus aegyptius*
5' GG/CC 3'

✓ *Pst*I - *Providencia stuartii*
5' CTGCA/G 3'

✓ Enzima de Restrição

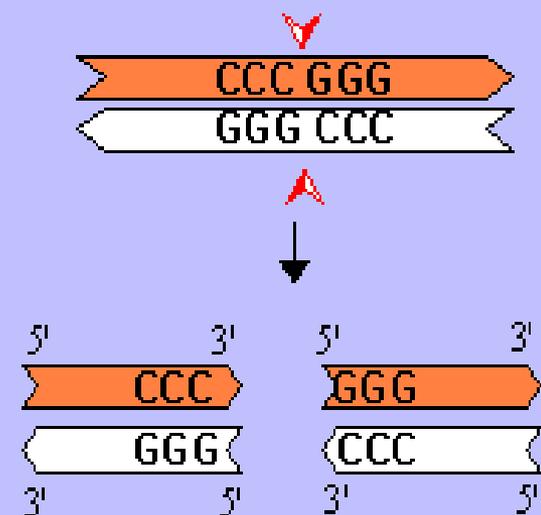
A. Corte assimétrico



Fragmentos com terminais coesivos

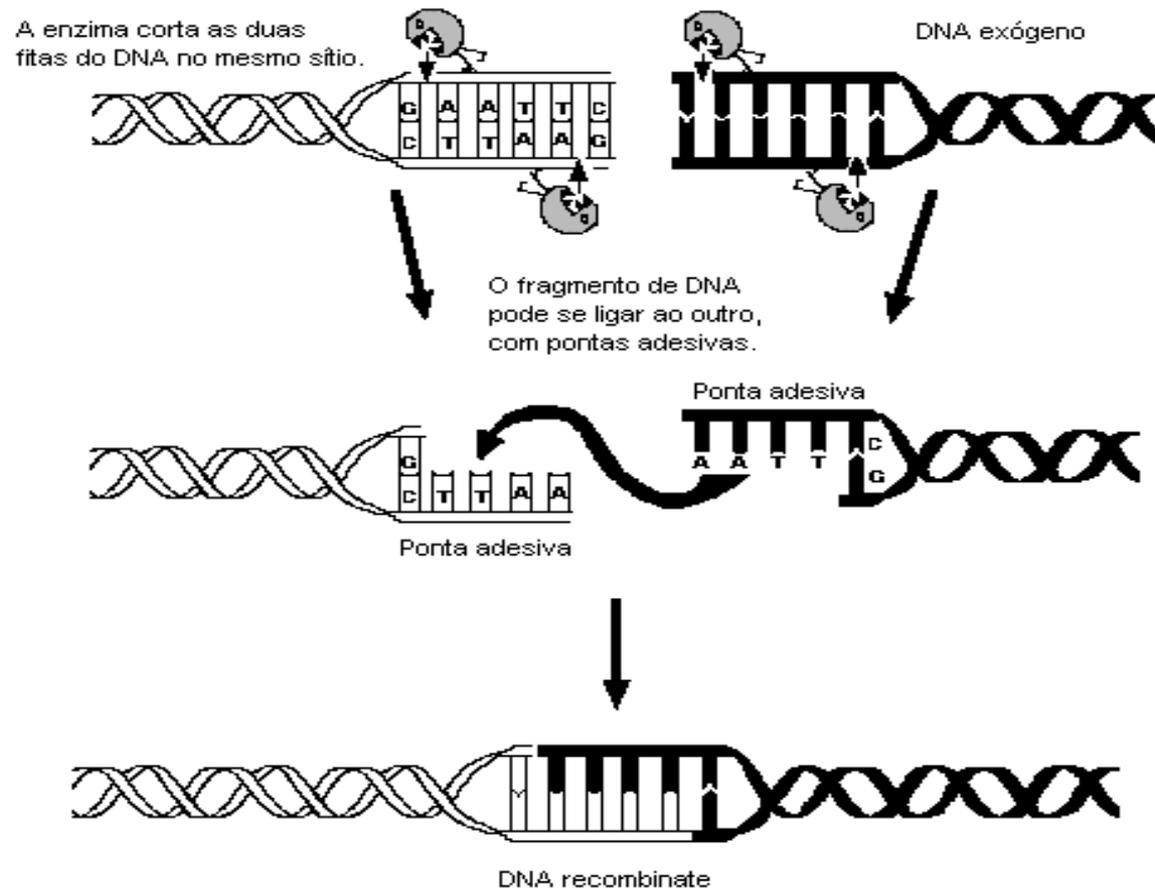
Separação dos
fragmentos

B. Corte simétrico



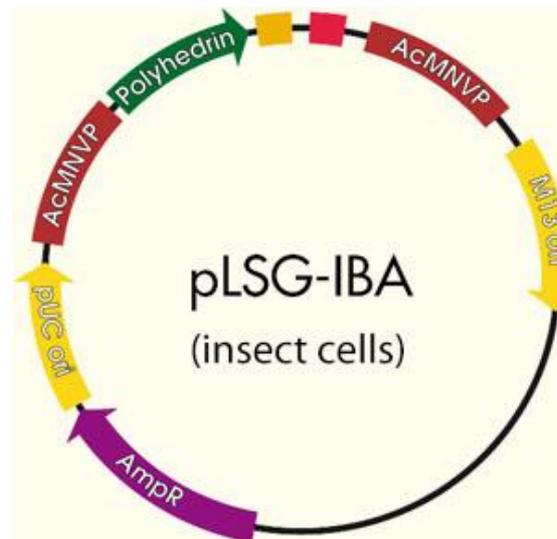
Fragmentos com terminais abruptos

Enzima de Restrição Ação da EcoR1



✓ Vetores

- ✓ Pequenas moléculas circulares que replicam independentemente do DNA cromossômico
- ✓ Produzem-se bactérias ou leveduras transgênicas que contêm o gene desejado, deixando -as depois multiplicarem -se, o que nos permite obter grandes quantidades dos genes pretendidos.



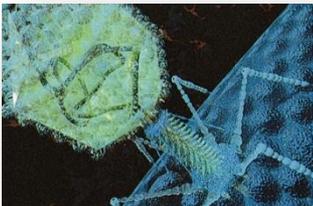
✓ Vetores

Vetores

Plasmídeos

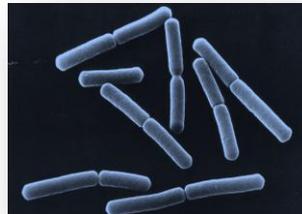


Bacteriófagos



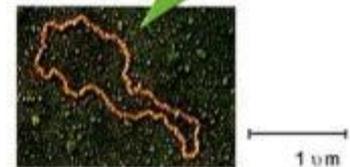
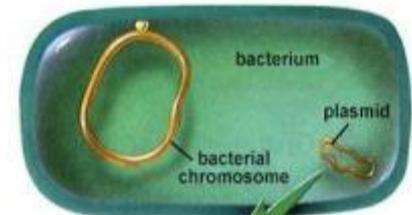
Hospedeiros

Bactérias/leveduras



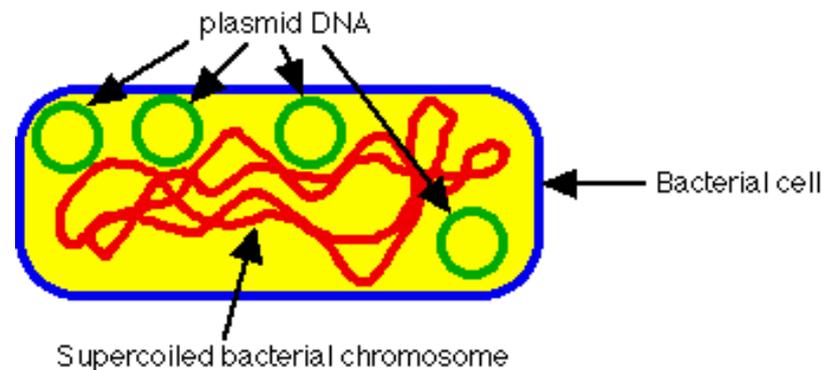
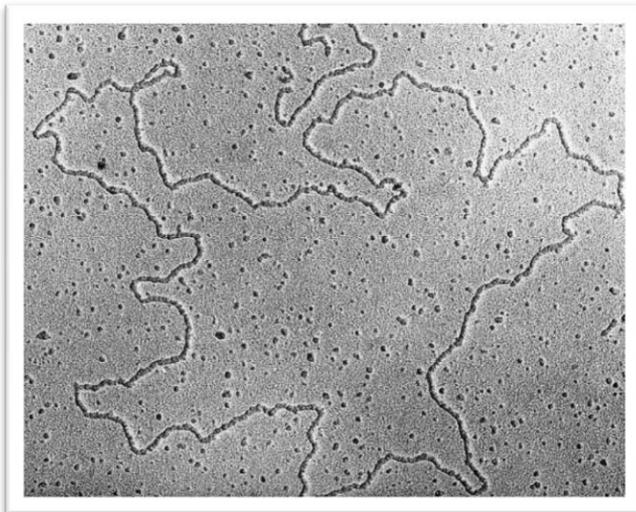
Utilização

Clonagem

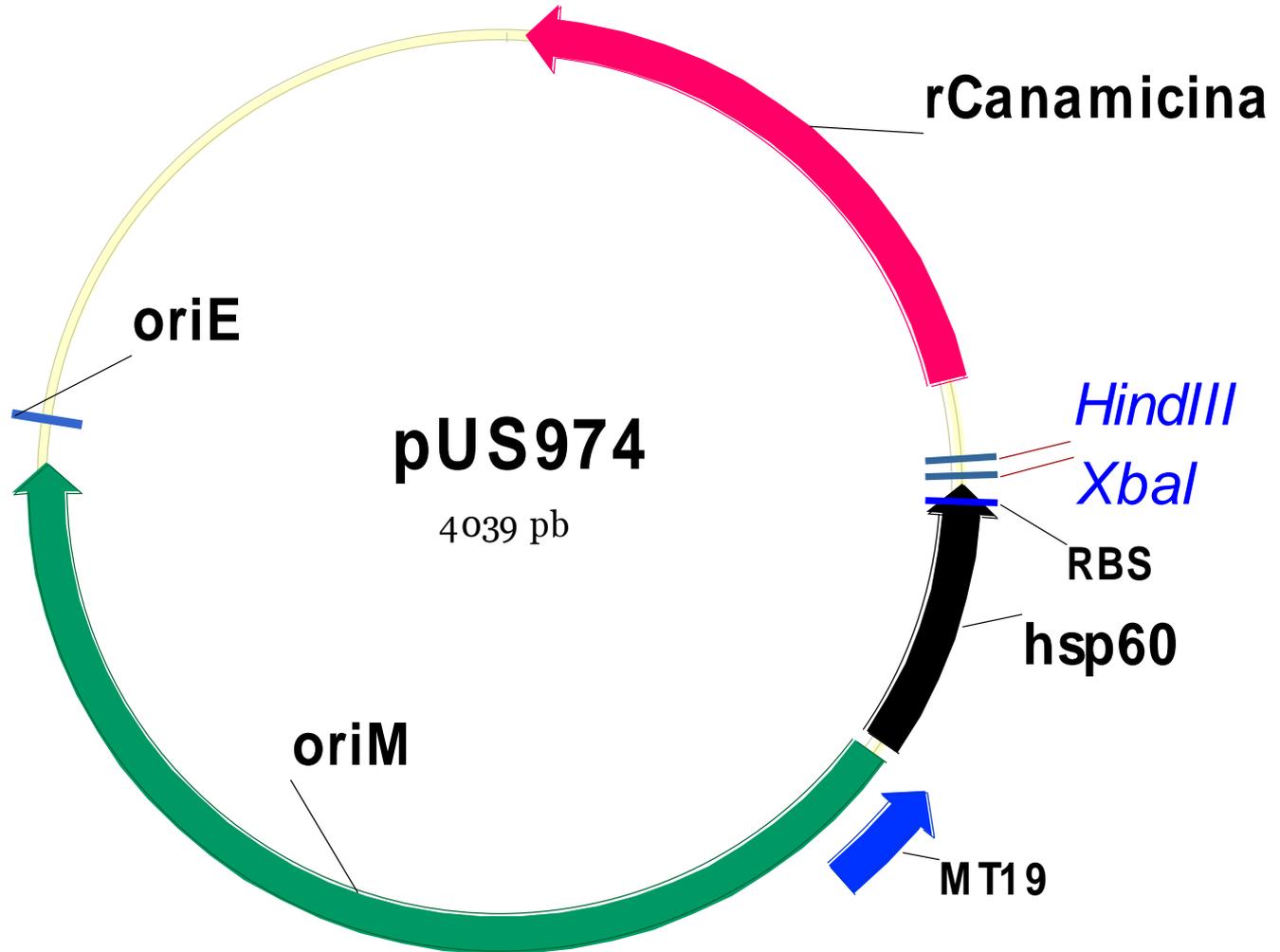


✓ Vetores - Plasmídeos

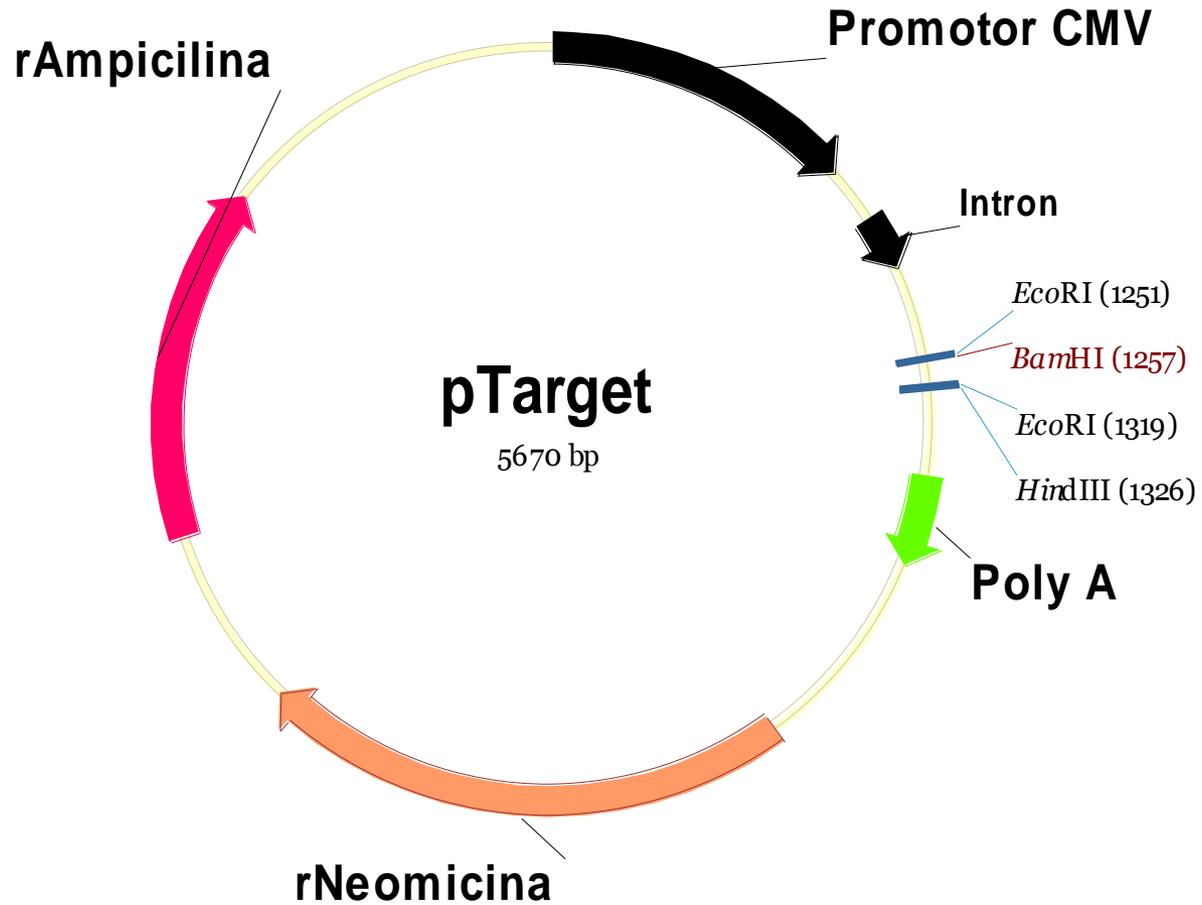
- ✓ Segmentos de material genético extracromossômico capazes de replicação autônoma na célula;
- ✓ Presentes em bactérias, vírus, leveduras, protozoários e plantas;
- ✓ Habilidade de se transferir fisicamente de uma célula para outra.



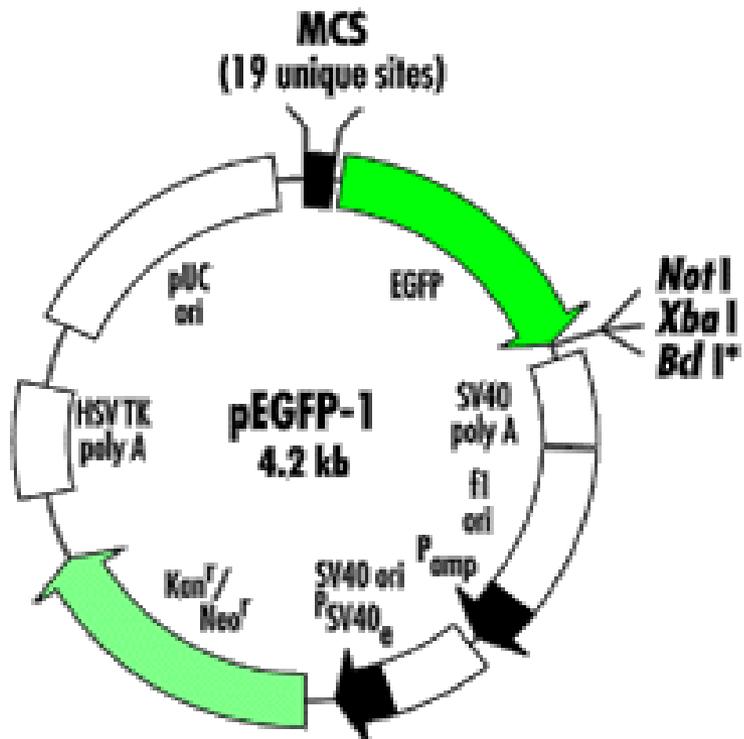
✓ Vetores - Plasmídeos



✓ Vetores - Plasmídeos



✓ Vetores - Plasmídeos

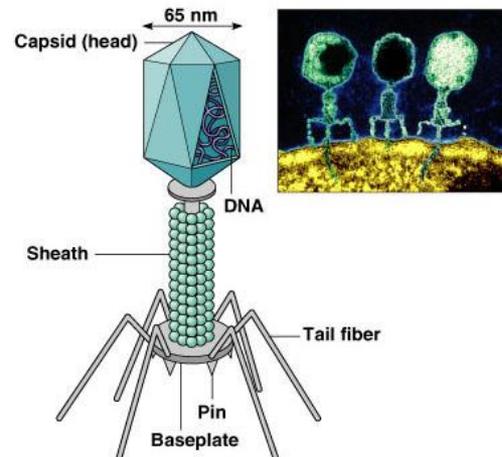


✓ Vetores - Bacteriófagos

✓ Parasita bacteriano.

✓ Só se reproduz dentro de uma bactéria.

✓ Usam os ribossomos, fatores de síntese de proteínas, aminoácidos e sistemas produtores de energia da célula hospedeira.



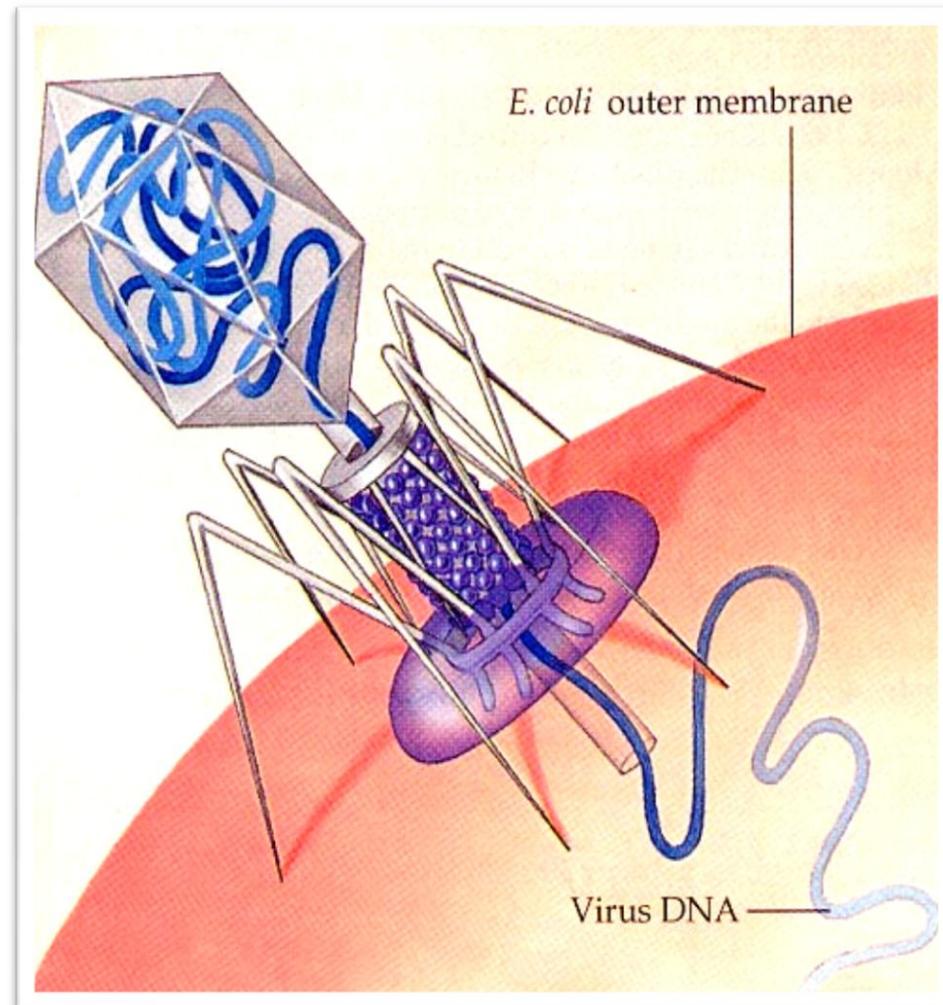
(a) A T-even bacteriophage

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

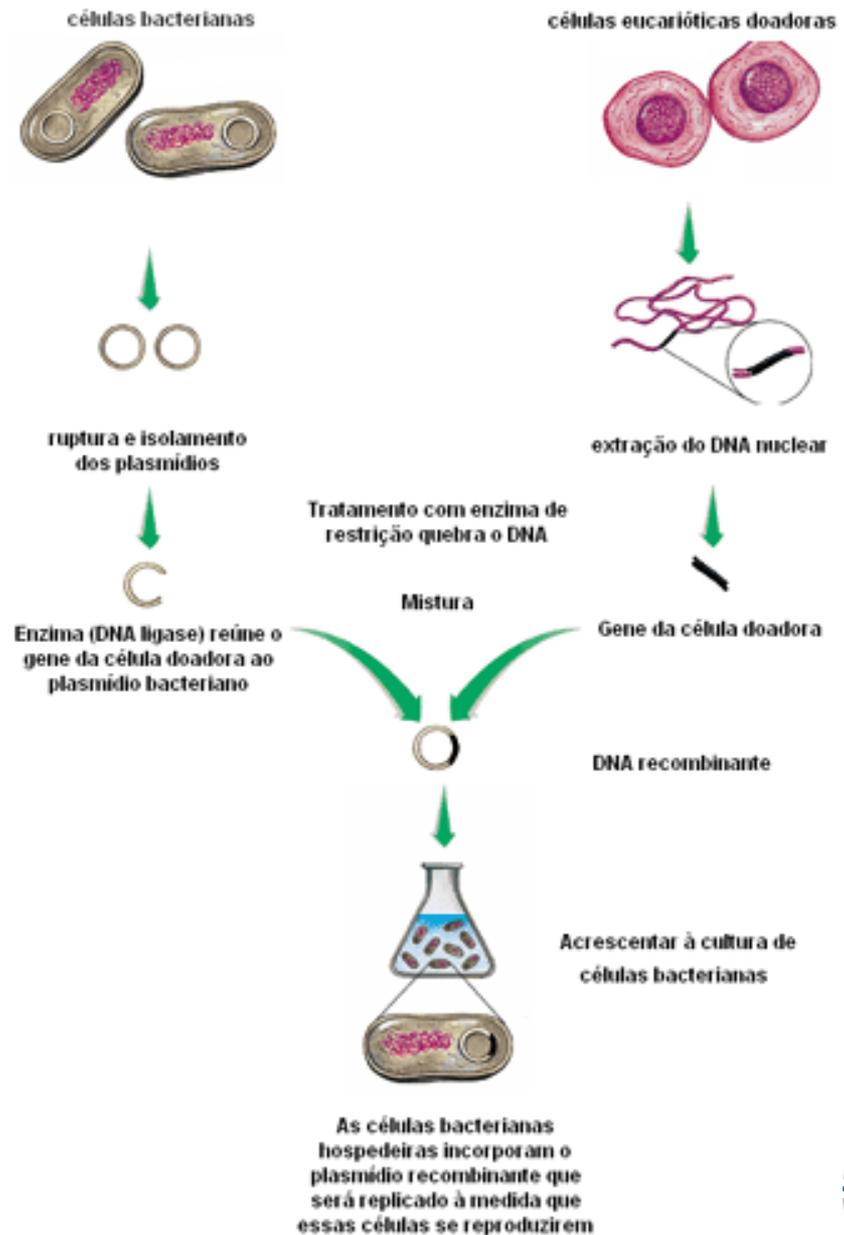
✓ Vetores – Bacteriófagos

✓ Virulento

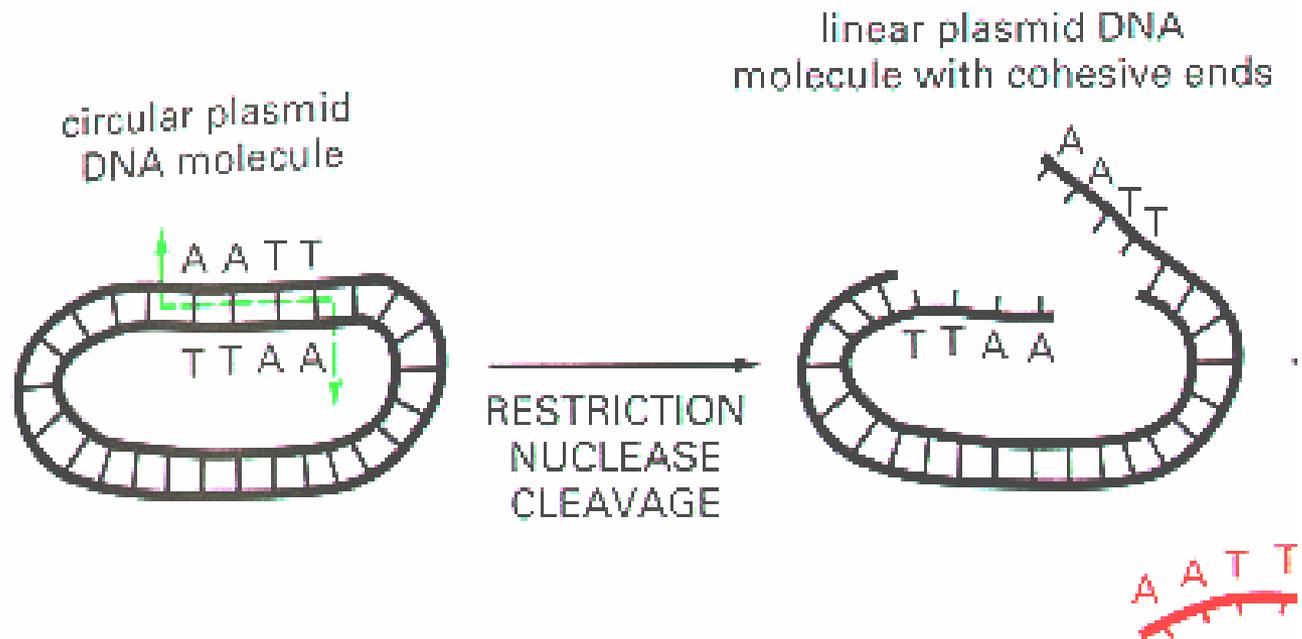
✓ Temperado



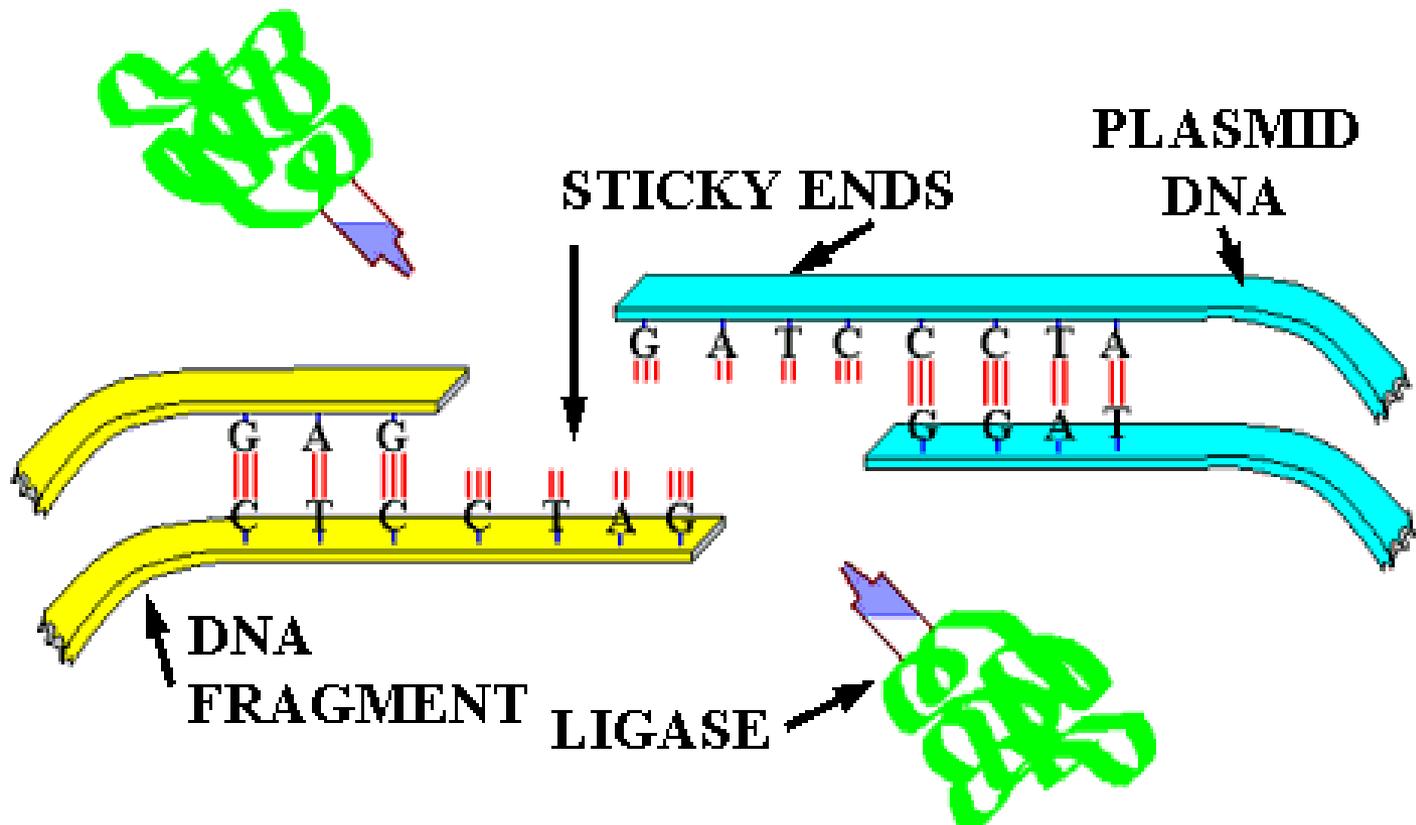
✓ **Construção DNA Recombinante**



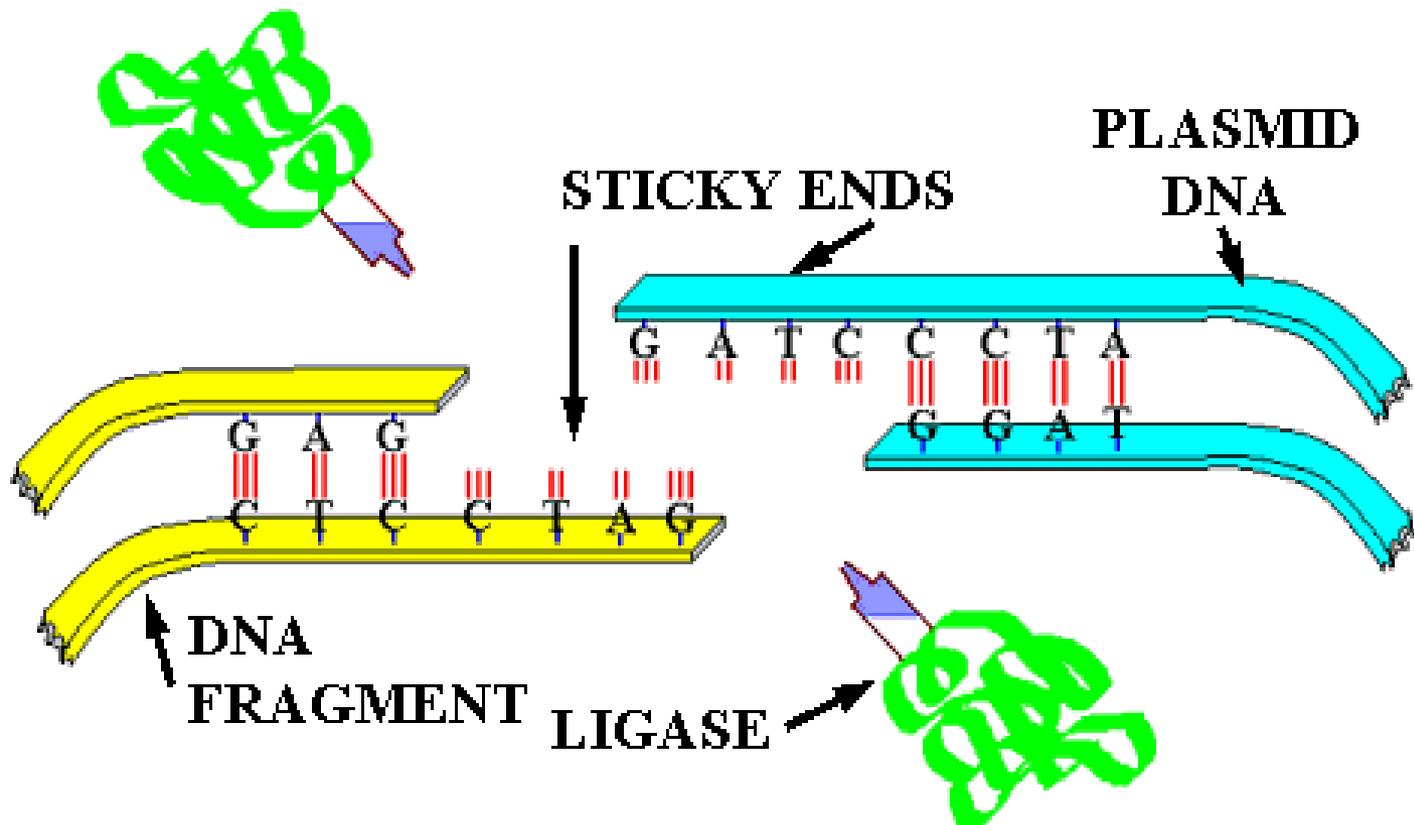
✓ Preparação do plasmídeo



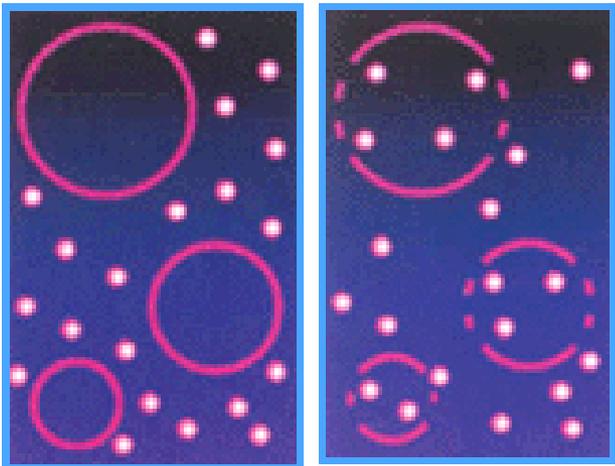
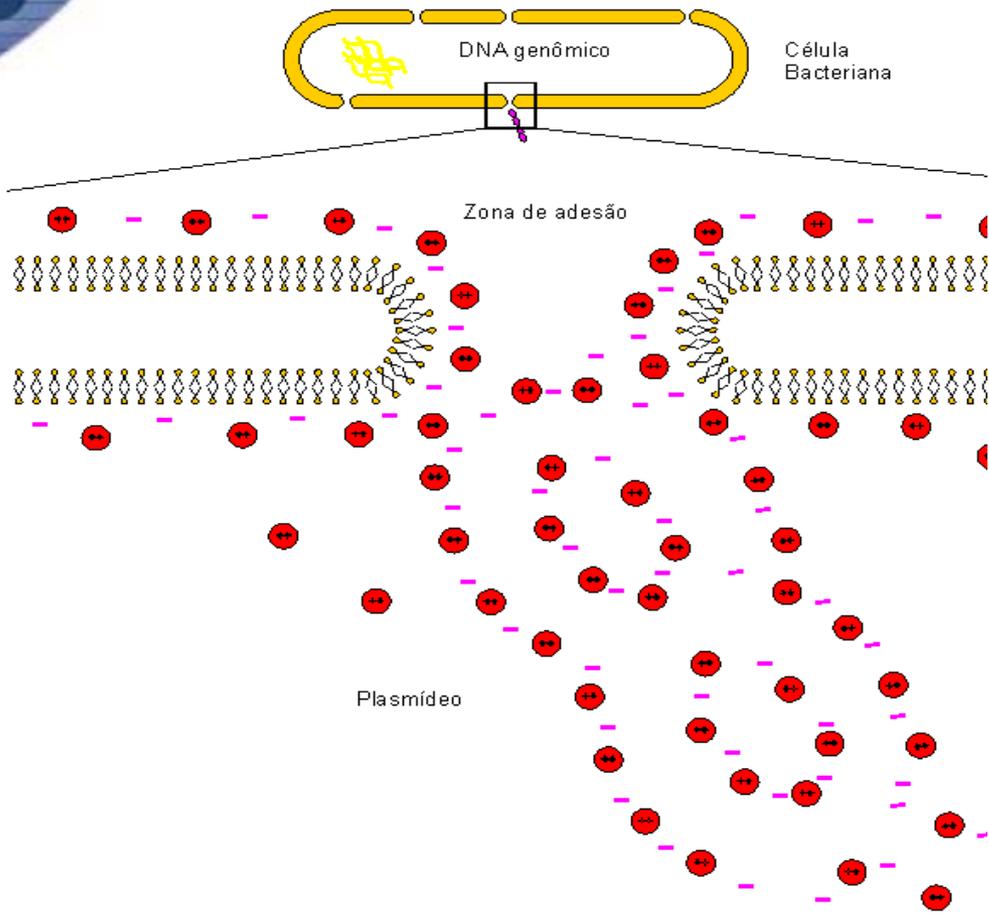
✓ Ligação do inserto ao plasmídeo



✓ Ligação do inserto ao plasmídeo



✓ Eletroporação



✓ Seleção dos clones



✓ **Clonagem Molecular**

✓ É o isolamento e a propagação em um organismo de moléculas idênticas de DNA

➤ Vacinas recombinantes

➤ Animais transgênicos

➤ Plantas transgênicas

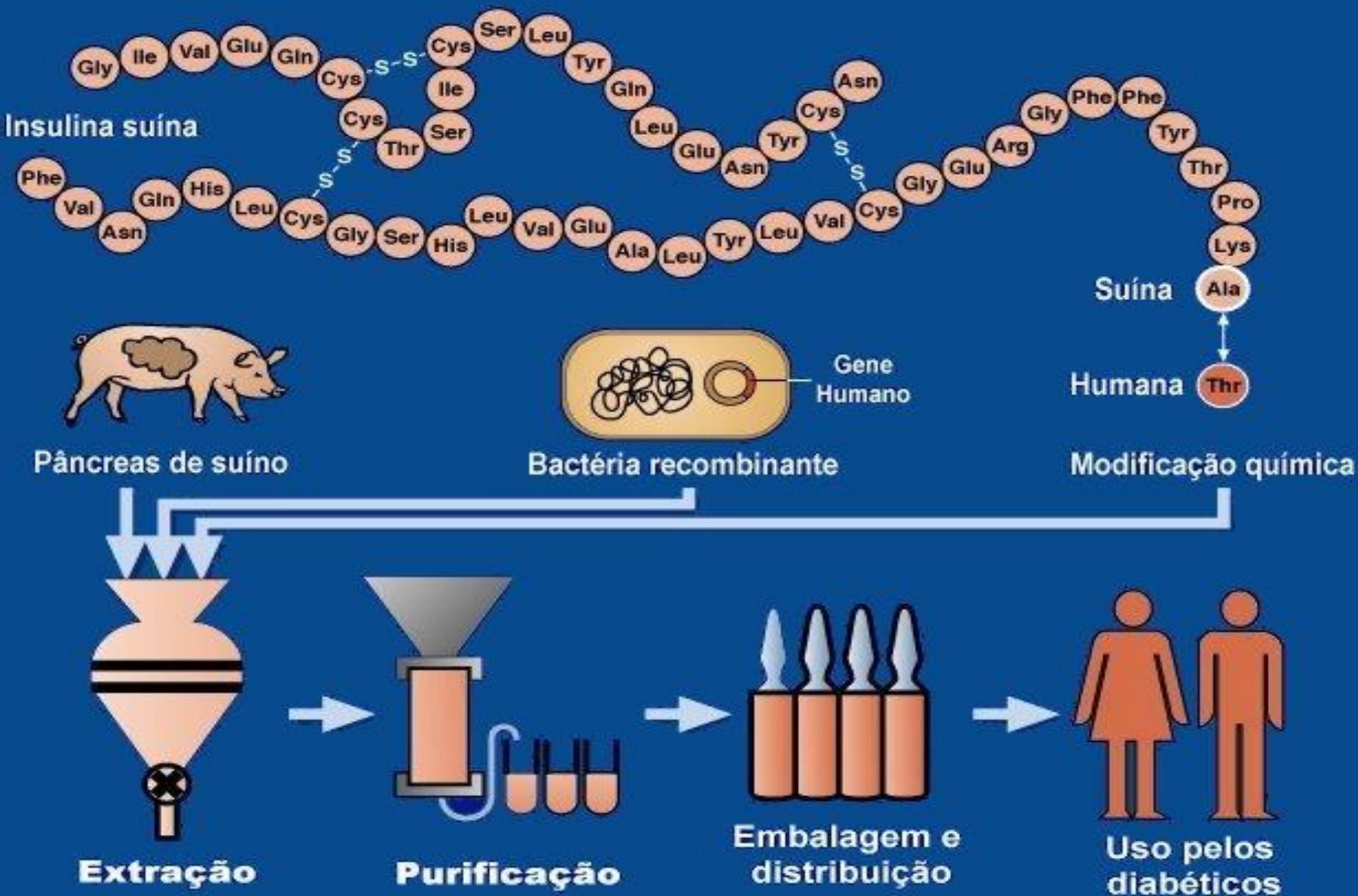


✓ **Clonagem Molecular**

✓ **Vacinas recombinantes**

- Vacina cinomose - recombitek[®] (merial)
 - Vacina hepatite b (butantan)
 - Vacina Inluenza A (h1N1)
 - Vacina BCG
-
-

Milhões de Diabéticos necessitam de Insulina para sobreviver



✓ **Clonagem Molecular**

✓ **Animais Transgênicos**

➤ Animais com genoma modificado – introdução de genes de outras espécies no núcleo de um óvulo fecundado

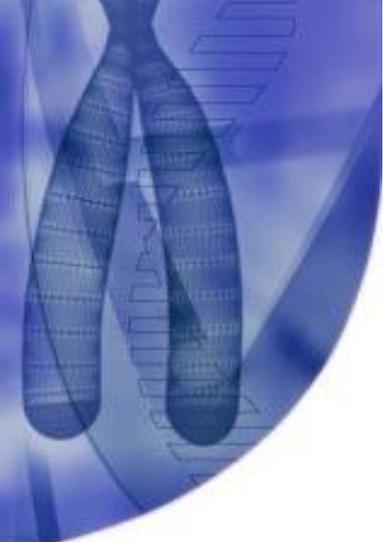
➤ **Objetivo: expressão do gene exógeno no hospedeiro**



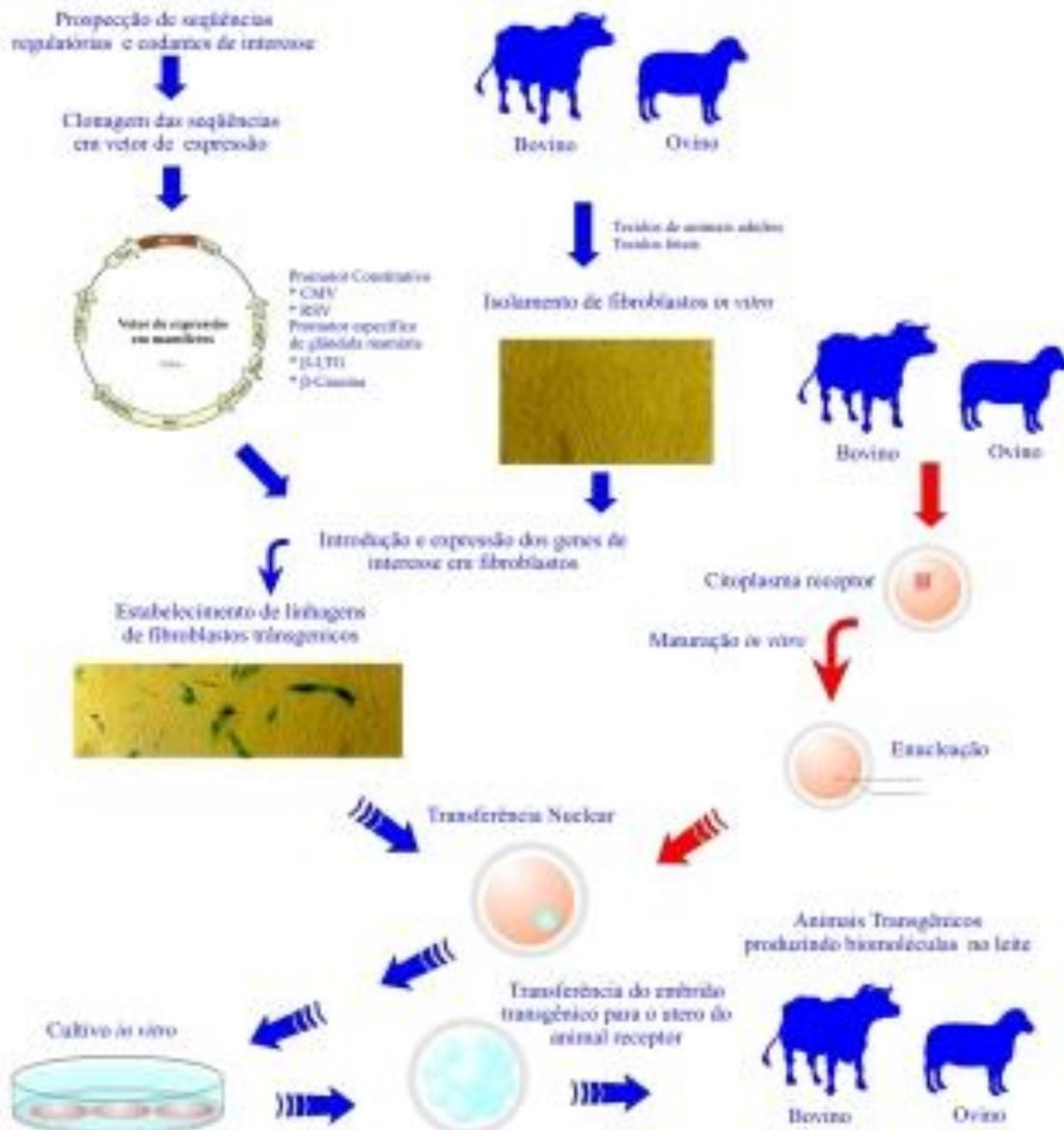
✓ **Clonagem Molecular**

✓ **Animais Transgênicos**

- Pesquisas - animais que desenvolvem doenças humanas (diabetes, obesidade)
- Xenotransplantes – suínos P33
- Produção de proteínas
- Animais como “biorreatores”



EXPRESSÃO DE BIOMOLÉCULAS EM ANIMAIS TRANSGÊNICOS



- ✓ **Clonagem Molecular**
 - ✓ **Animais Transgênicos**



✓ Clonagem Molecular

✓ Plantas Transgênicas



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



PCR

Reação em Cadeia da Polimerase

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL

✓ PCR

- ✓ Outubro de 1985 (idéia em 1983)
- ✓ criado por Kary B. Mullis

✓ Conceito: Replicação sequencial do DNA *in vitro*

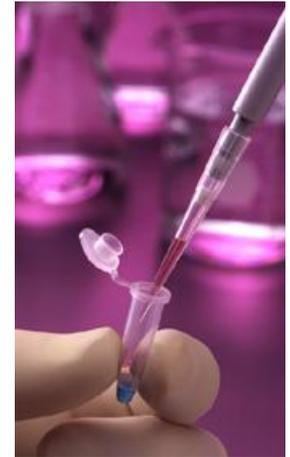
✓ *Objetivos:*

- ✓ *Clonagem de Genes*
- ✓ *Identificação de Mutação*
- ✓ *Diagnóstico de Doenças*
- ✓ *Controle de Qualidade*
- ✓ *Taxonomia*
- ✓ *Medicina forense*
- ✓ *Variabilidade Genética*

- ✓ Variações da reação de PCR
 - ✓ RT-PCR (Transcriptase reversa): Expressão Gênica
 - ✓ Multiplex PCR: Sexagem embriões
 - ✓ Nested PCR: Aumento sensibilidade e especificidade
 - ✓ Hot-Start PCR: Amplificação inespecífica
 - ✓ PCR em Tempo Real: Visualização do aumento da quantidade
 - ✓ Nested Supression PCR (NSP): Sequências desconhecidas

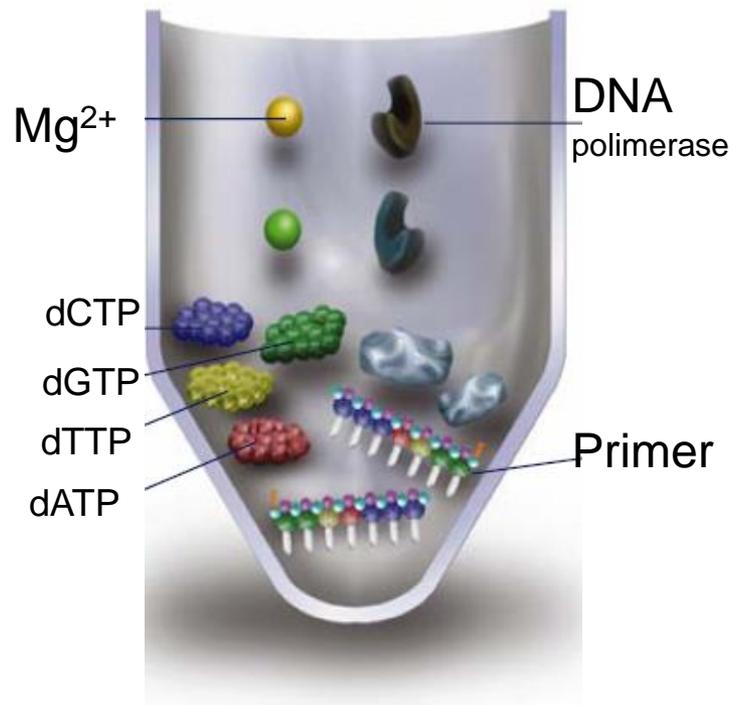
✓ PCR

✓ Componentes: DNA/RNA, Polimerase, Tampão, $MgCl_2$, dNTPS, *Primers*.

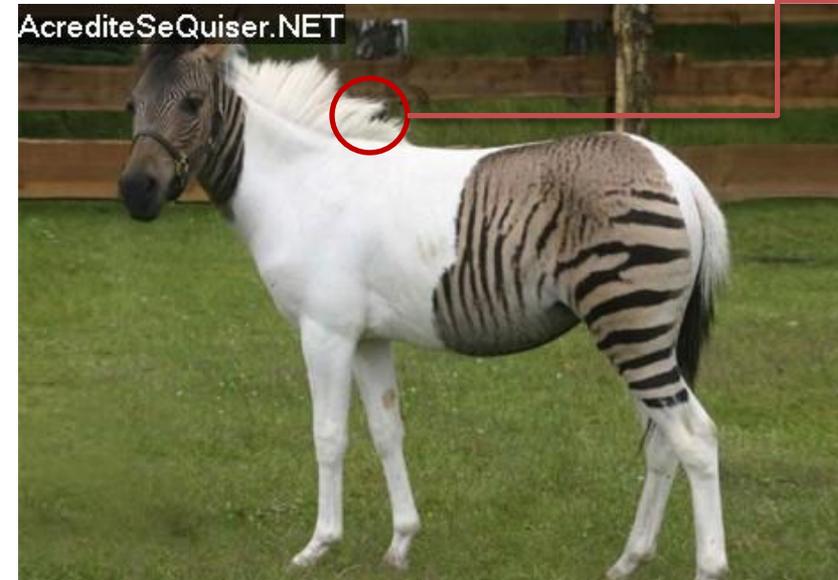
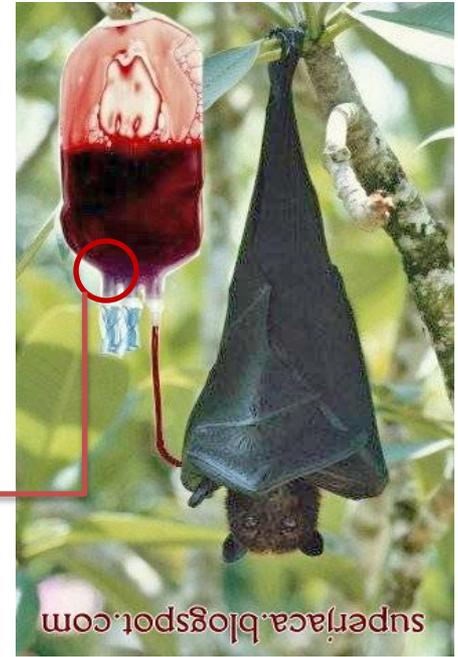


✓ PCR

✓ Componentes: DNA/RNA, Polimerase, Tampão, $MgCl_2$, dNTPS, *Primers*.



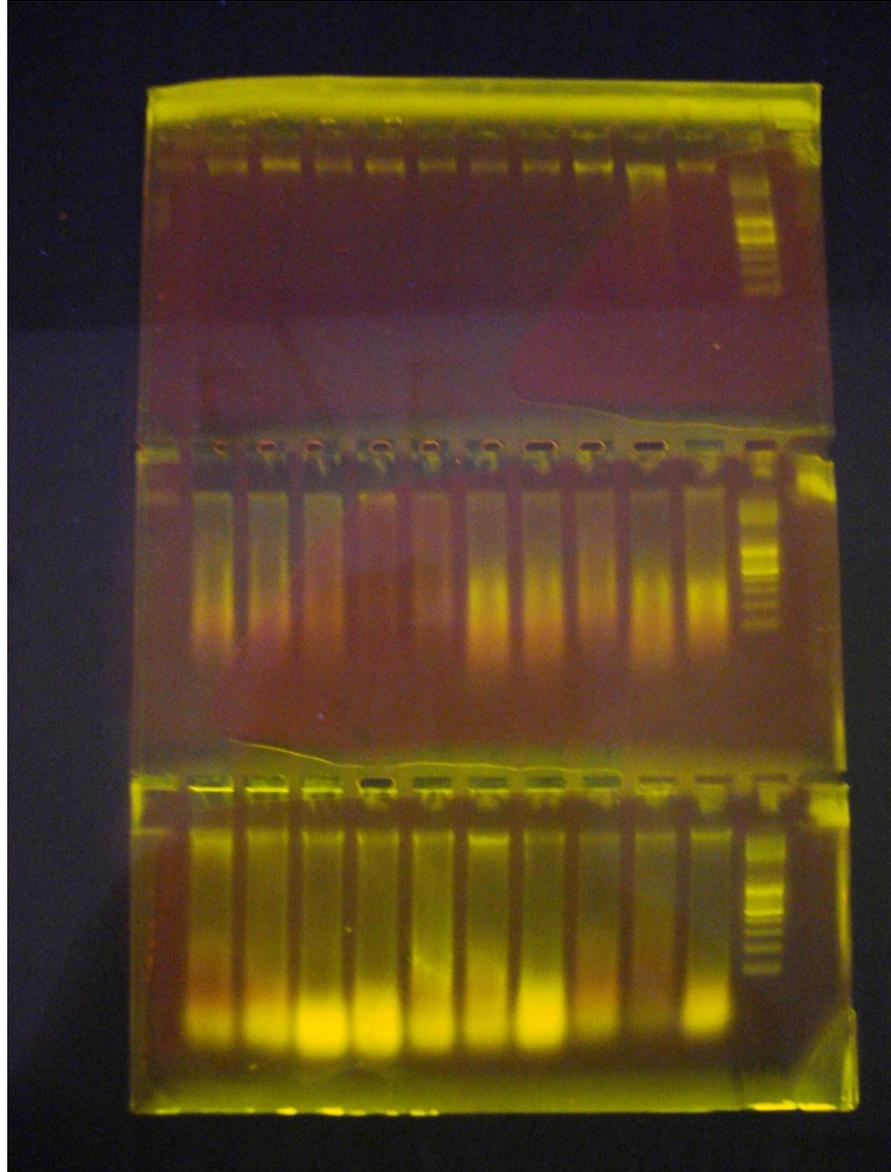
✓ Coleta de Material



✓ Extração de DNA

- 1 – Preparo do material
- 2 – Lise
- 3 – Purificação
- 4 – Precipitação
- 5 – hidratação





✓ DNA Polimerase: Taq

✓ *Thermus aquaticus*

✓ Polimerização: 5'---> 3'

✓ Proteína de 94 kDa

✓ Temperatura ótima: 75 a 80°C

✓ Termoestabilidade limitada

✓ Ausência de função de edição 3'---> 5'

✓ Exonuclese 3' ---> 5

✓ Exonuclese 5' ---> 3

Lago do “Yellowstone National Park”



✓ DNA Polimerase: Taq

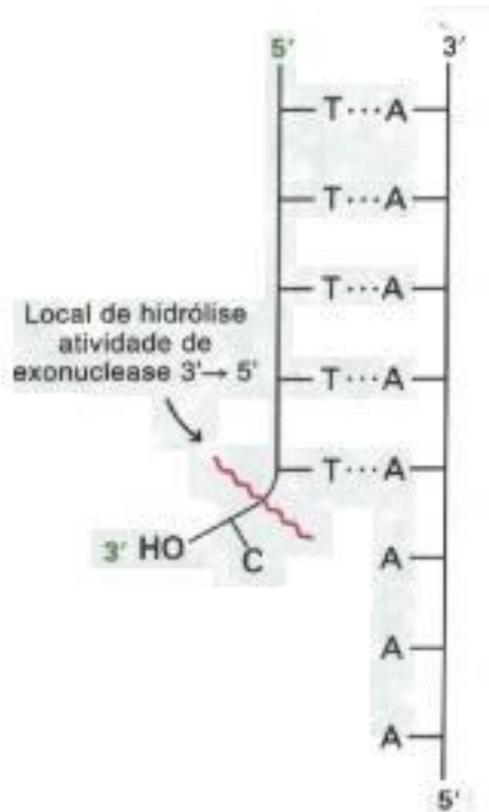


Figura 31.24 Ação de exonuclease 3' → 5' da DNA polimerase I.



Ação de nuclease 5' → 3' da DNA polimerase I.

✓ Desenho de Primers

✓ Tamanho: 15 a 30pb

✓ Concentração de CG: 40-50%

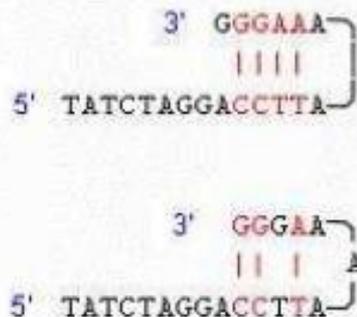
✓ Reduzida regiões de dímeros e hairpins

✓ Temperatura de Anelamento: em torno de 55°C

$$T_{\text{anel}} = T_m - 4^{\circ}\text{C}$$

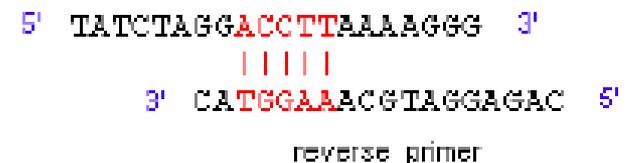
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^{\circ}\text{C}$$

Hairpin



Dimer

forward primer



✓ Tipos de Primers

✓ Primers *forward e reverse*

✓ Primers Universais: Múltiplos Produtos

✓ Primers Semi-Universais: Subgrupos

✓ Primers Degenerados: Sequência difíceis de serem alinhadas

```
ATCGATGGGATACCCATCGAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
ATCGATATGATACCCATCGAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
ATCGATGGGATACCCATCGAGTTAGCTAGCATGCGCGATA
ATCGATGGGATACCCATCGAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
TATGGGTAGCTCAATCG
```

```
TGGGTAGATCAATCGAT
TGGGTAGCTCAATCGAT
```

```
ATCGATGGGATACCCATCGAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
ATCGATGGGATACCCATCTAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
ATCGATGGGATACCCATCTAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
ATCGATGGGATACCCATCGAGTTAGCTAGCCGATGCGATA
```

✓ Busca da região codificante

NCBI HomePage - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Google ncbi

NCBI National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine National Institutes of Health

PubMed All Databases BLAST OMIM Books TaxBrowser Structure

Search All Databases for Go

SITE MAP
Alphabetical List
Resource Guide

About NCBI
An introduction to NCBI

GenBank
Sequence submission support and software

Literature databases
PubMed, OMIM, Books, and PubMed Central

Molecular databases
Sequences, structures, and taxonomy

Genomic biology

What does NCBI do?

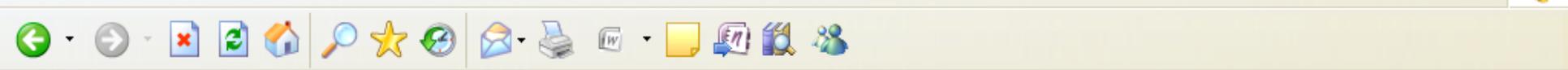
Established in 1988 as a national resource for molecular biology information, NCBI creates public databases, conducts research in computational biology, develops software tools for analyzing genome data, and disseminates biomedical information - all for the better understanding of molecular processes affecting human health and disease. [More about NCBI...](#)

Hot Spots

- ▶ Assembly Archive
- ▶ Clusters of orthologous groups
- ▶ Coffee Break, Genes & Disease, NCBI Handbook
- ▶ Electronic PCR
- ▶ Entrez Home
- ▶ Entrez Tools
- ▶ Gene expression omnibus (GEO)
- ▶ Human genome resources
- ▶ Influenza Virus Resource
- ▶ Map Viewer

dbGaP: NCBI's Genome Wide Association Database

NCBI's [dbGaP](#) (database of Genotype and Phenotype) provides data from Genome Wide Association (GWA) studies, which are helping elucidate the link between genes and disease. For each study, users have access to detailed information about the phenotypic variables measured and pre-computed associations between subjects' phenotypes and genotypes. For more about dbGaP, see:



JOURNAL Submitted (13-JUN-2003) Ictiofisiologia y Acuicultura, Instituto de Investigaciones Biotecnologicas-Instituto Tecnologico de Chascomus (IIB-INTECH), Camino de Circunvalacion Laguna Km 6, Chascomus, Buenos Aires B7130IWA, Argentina

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..425

/organism="Odontesthes bonariensis"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:219752"

/tissue_type="pituitary"

[CDS](#) <1..>425

/note="pjPRL"

/codon_start=2

/product="prolactin"

/protein_id="AAP84610.1"

/db_xref="GI:32482459"

/translation="MLTQELDSHFPPIGRVIMPRPTSCHTSSLQTPNDKDQALQVSES
ALMSLARSLLQAWVDPLVVLSHSASTLPHPAQSTINNKIQELQQHSKSLGDLGDLILSN
KMGPAQAISSLPYRGATDPGQDKISKLVHFNFLLSCLR"

ORIGIN

```

1 gatgctcact caggagctgg actctcattt cctccaata ggcagggtca tcatgccgcg
61 cccaacttgc tgccacacgt cctcgctaca gacgccaat gacaaagacc aagctctgca
121 agtatcagag tctgctctga tgctgctggc tcgctccctg ctccaagcct ggggtggacc
181 cctgggtggc ctgtcccact ctgctagcac tctgcctcac ccagcccaa gcaactataa
241 caacaagatc caggagctgc aacagcactc aaaaagcctg ggagatggcc tggatatact
301 atccaacaag atgggtccgg ctgctcaggc catctcctca ctgccatata gaggagccac
361 tgatccgggc caggacaaga tatctaaact tgtccacttt aactttctgc tgtcctgct
421 tcgcc

```

//

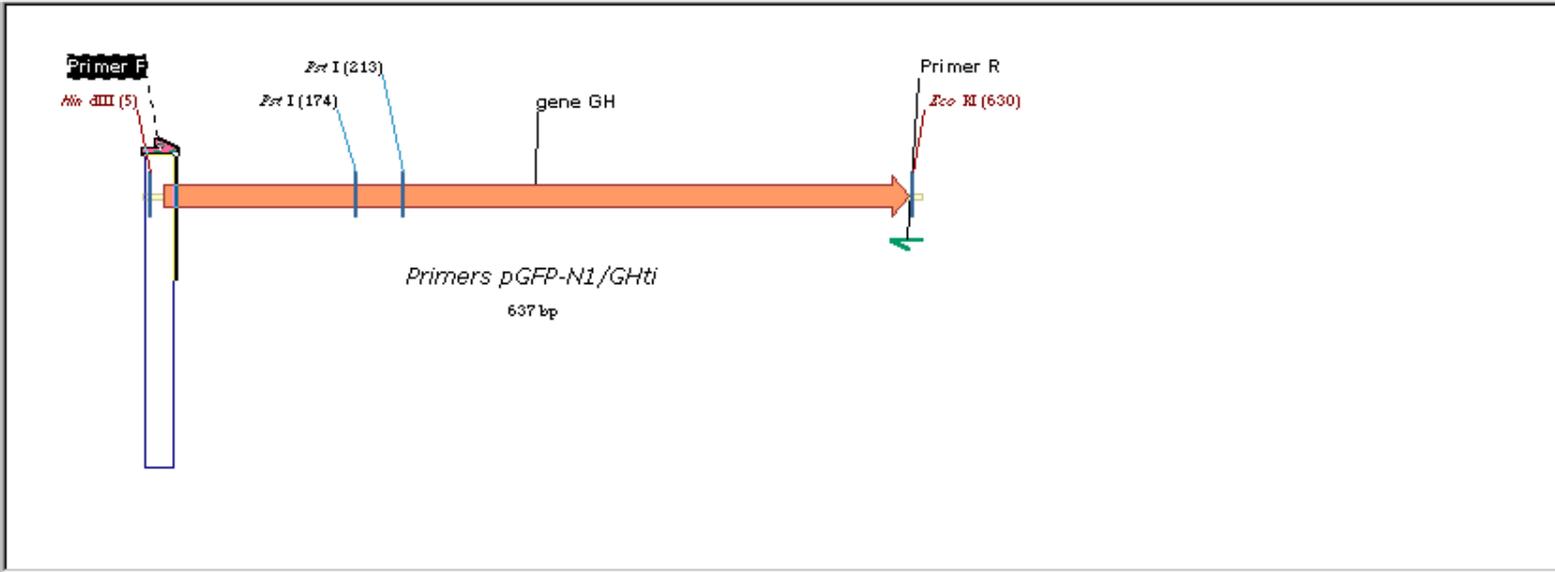
[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLN](#) | [NIH](#)

Molecule Edit View Analyses Gel List Align Assemble Tools Window Help

Active Pane: [Icons]

Primers pGFP-N1/GHti

- General Description
- Standard Fields
- References
- Comments
- Annotations
- Feature Map
- Restriction/Methylation Ma



HindIII
 1 TAGAAGCTTC CAGCCATGAA CTCAGTCGTC CTCCTGCTGT CGGTTGTGTG TTTGGGGCGTC TCCTCTCAGC AGATCACAGA CAGCCAGCGT TTGTTCTCCA
 ATCTTCGAAG GTCGGTACTT GAGTCAGCAG GAGGACGACA GCCAACACAC AAACCCGCAG AGGAGAGTCG TCTAGTGTCT GTCGGTCGCA AACAAAGAGGT

PstI
 101 TTGCAGTCAA CAGAGTCACG CACCTGCACC TGCTCGCCCA GAGACTCTTC TCGGACTTTG AGAGCTCTCT GCAGACGGAG GAGCAACGTC AGCTCAACAA
 AACGTCAGTT GTCTCAGTGC GTGGACGTGG ACGAGCGGGT CTCTGAGAAG AGCCTGAAAAC TCTCGAGAGA CGTCTGCCTC CTCGTTGCAG TCGAGTTGTT

PstI
 201 AATCTTCCTG CAGGACTTCT GCAACTCTGA TTACATCATC AGCCCGATCG ACAAACACGA GACGCAGCGC AGCTCGGTCC TGAAGCTGCT GTCGATCTCC
 TTAGAAGGAC GTCCTGAAGA CGTTGAGACT AATGTAGTAG TCGGGCTAGC TGTTTGTGCT CTGCGTCGCG TCGAGCCAGG ACTTCGACGA CAGCTAGAGG

301 TATGGACTGG TTGAGTCTCG GGAGTTTCCC AGTCGCTCTC TGTCTGGAGG TTCCTCTCTG AGGAACCAGA TTTCACCAAG GCTGTCTGAG CTTAAAACGG
 ATACCTGACC AACTCAGGAC CCTCAAAGGG TCAGCGAGAG ACAGACCTCC AAGGAGAGAC TCCTTGGTCT AAAGTGGTTC CGACAGACTC GAATTTTGCC

401 GAATCTTGCT GCTGATCAGG GCCAATCAGG ATGAAGCAGA GAATTATCCT GACACCGACA CCCTCCAGCA CGCTCCTTAC GGAAACTATT ATCAAAGTCT
 CTTAGAACGA CGACTAGTCC CGGTTAGTCC TACTTCGTCT CTTAATAGGA CTGTGGCTGT GGGAGGTCGT GCGAGGAATG CTTTGATAA TAGTTTCAGA

501 GGGAGGCAAC GAATCGCTGA GACAAACTTA TGAATTGCTG GCTTGCTTCA AGAAGGACAT GCACAAGGTG GAGACCTACC TGACGGTAGC TAAATGTCGA
 CCCTCCGTTG CTTAGCGACT CTGTTTGAAT ACTTAACGAC CGAACGAAGT TCTTCTGTA CGTGTTCAC CTCTGGATGG ACTGCCATCG ATTTACAGCT

EcoRI
 601 CTCTCTCCAG AACCAACTC CACTCTCACA ATTCCCT



BIONEER
ISO 9000:2001 Certified

Company: Bioneer Ltd.
 Phone: +82 (0)42 950 8500
 Fax: +82 (0)42 950 8700
 E-mail: sales@bioneer.com
 Web: www.bioneer.com



New Technology Certification from ATS (Korea)

Bioneer Oligo Synthesis Report

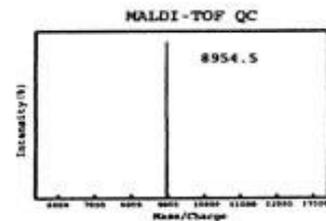
Dr. Heden Luiz

Lot Number : 061201-33

GSP1-PRL-OB

GCT TGG TCT TTG TCA TTG GGC GTC TGT AG

Optical Density	3.0 OD	Purification	Bio-RP
Total nmole	10.3 nmole	Modification	None
Scale	0.025 umoles	GC content	51.7 %
Length	29 mer	Molecular Weight	8952.6 g/mole
Tm	67.8 C	Volume for	103.0 ul
		100 pmoles/ul	



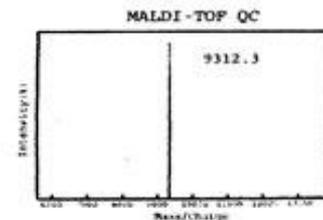
Dr. Heden L

Lot Number : 070528-79

PRLPR-ext6

GTC TTT GTC ATT GGG CGT CTG TAG CGA GGA

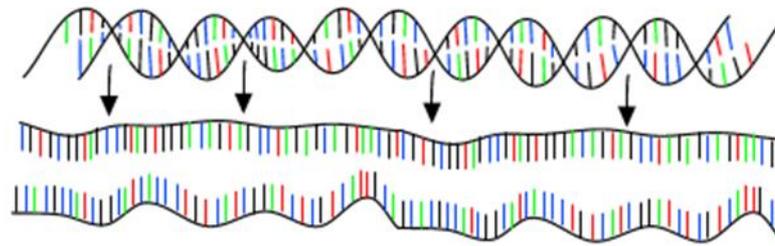
Optical Density	3.0 OD	Purification	Bio-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	None
Scale	0.025 umoles	GC content	53.3 %
Length	30 mer	Molecular Weight	9299.8 g/mole
Tm	70.5 C	Volume for	95.0 ul
		100 pmoles/ul	



✓ PCR

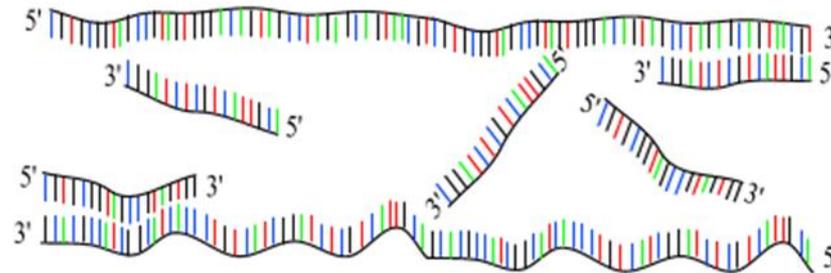
✓ Ciclo da reação

1- Desnaturação



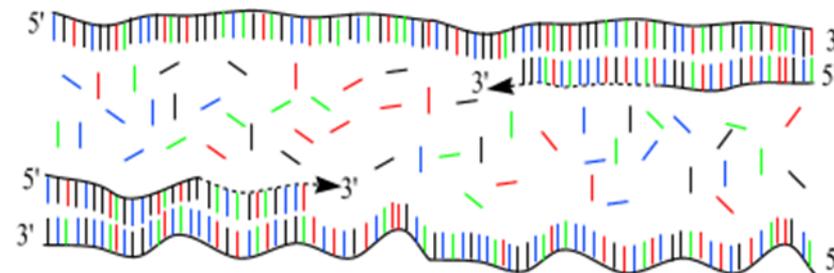
94 - 95°C

2- Anelamento



50 - 65°C

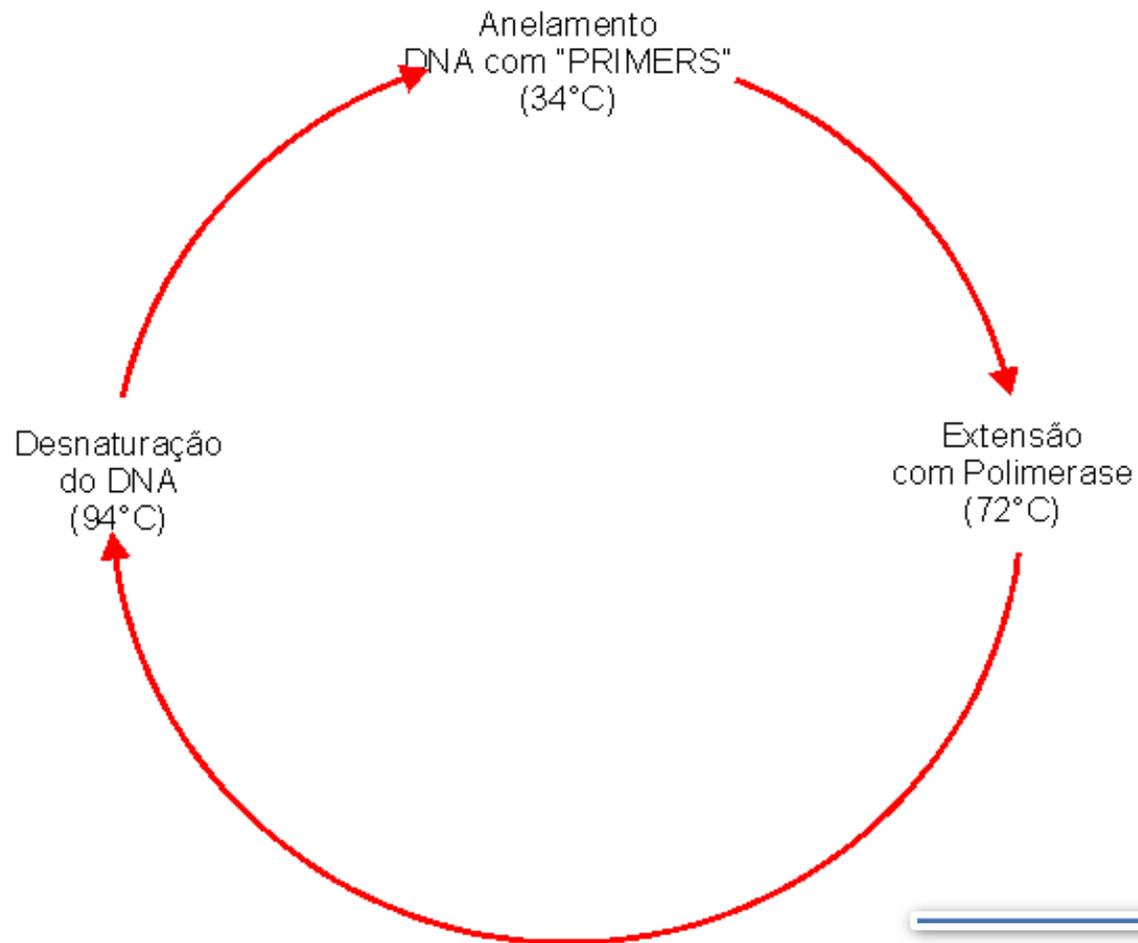
3 - Extensão



72°C

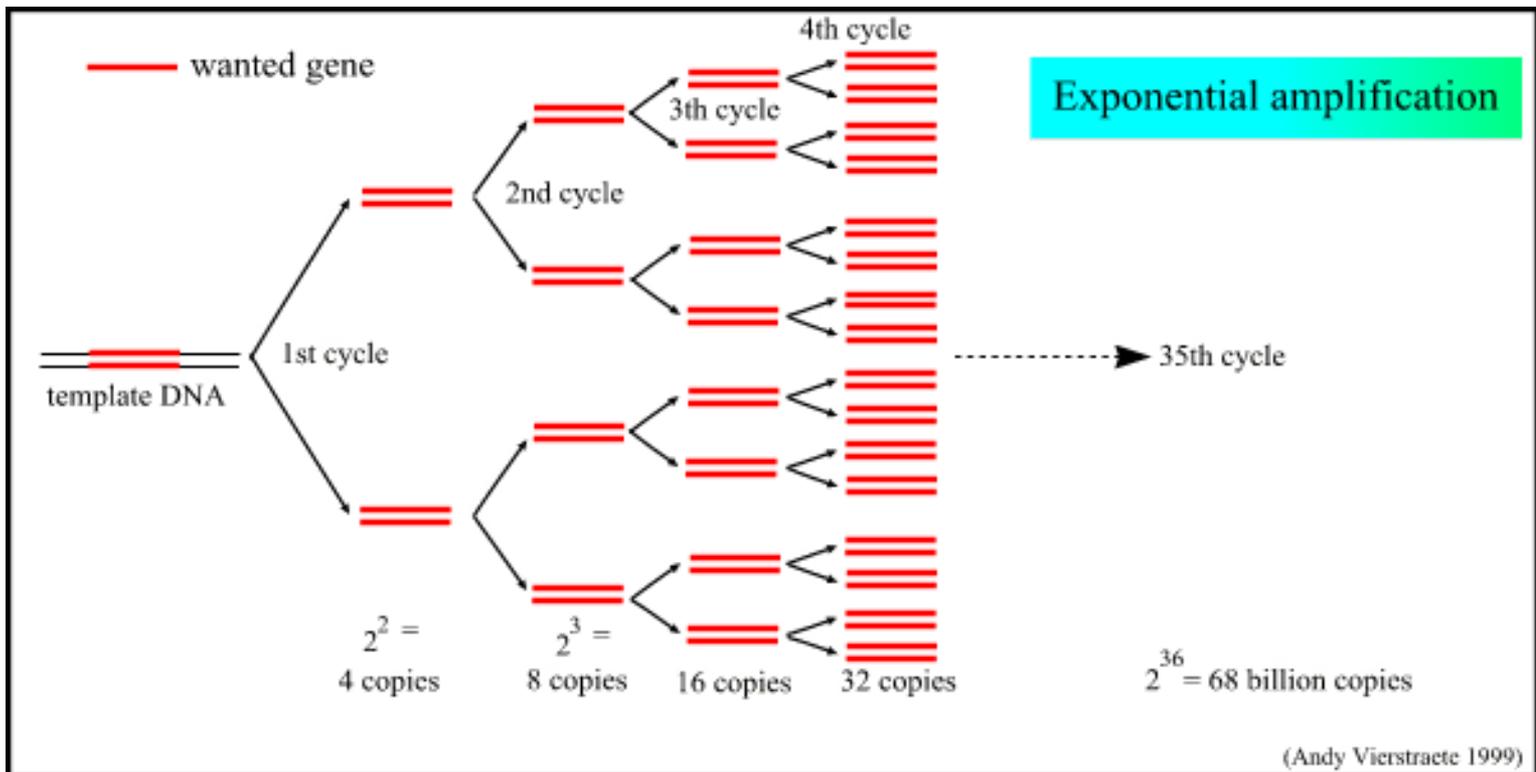
✓ PCR

✓ Ciclo da reação



✓ PCR

✓ Repetição do ciclo



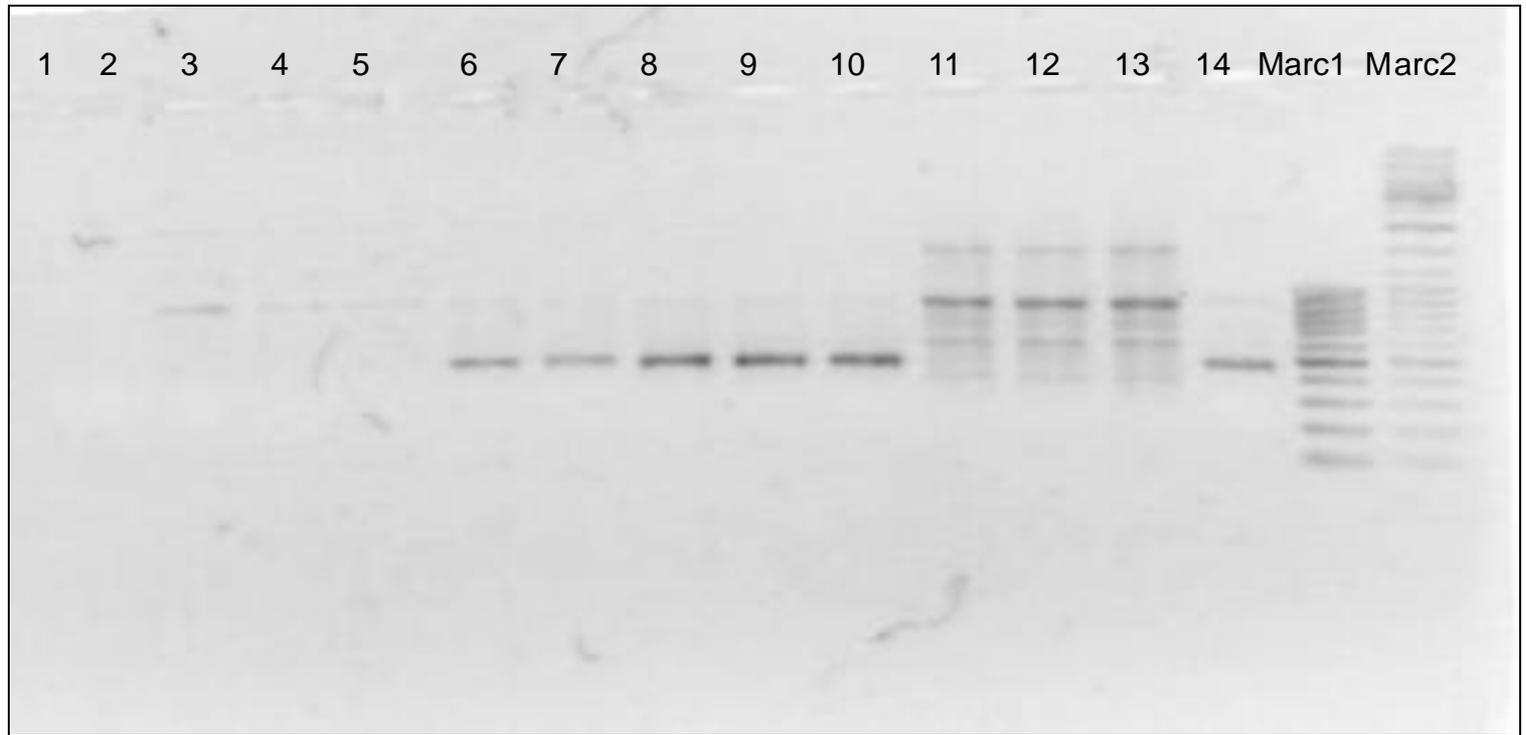
✓ Volume da Reação

	Vol. (µl)/tubo	Vol. (µl)/6 tubos
H ₂ Odd	17,7	106,2
10x Buffer	2,5	15,0
Mgcl ₂	1,5	9,0
dNTPs	0,5	3,0
Primer	1,0	6,0
Taq[®]	0,8	4,8
DNA/ H ₂ Odd	1,0	6,0
Total	25,0	150,0

✓ Tempo da Reação

	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	94	5'
Desnaturação	94	30''
Anelamento	56	60''
Extensão	72	3'
Extensão final	72	7'
Em espera	15	-
Ciclos: 35x		

✓ Eletroforese em gel de agarose



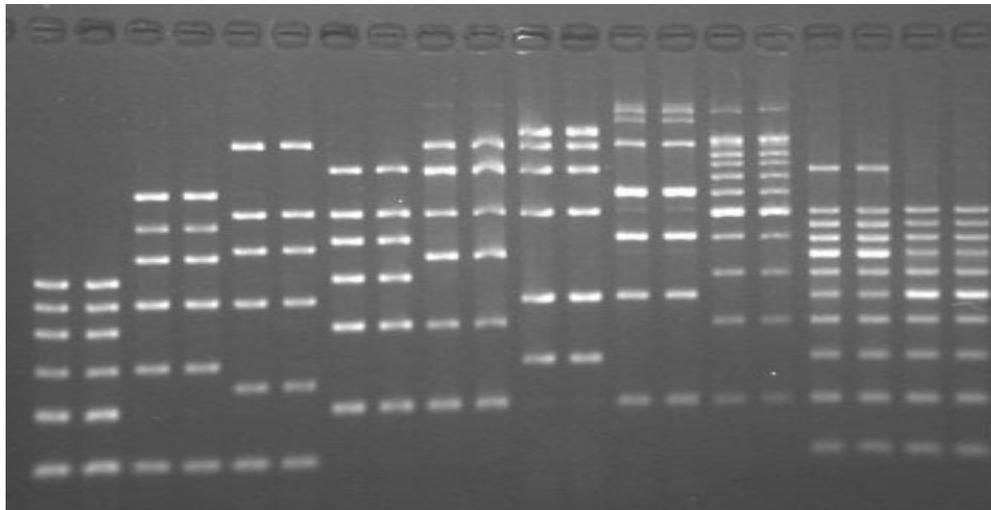
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

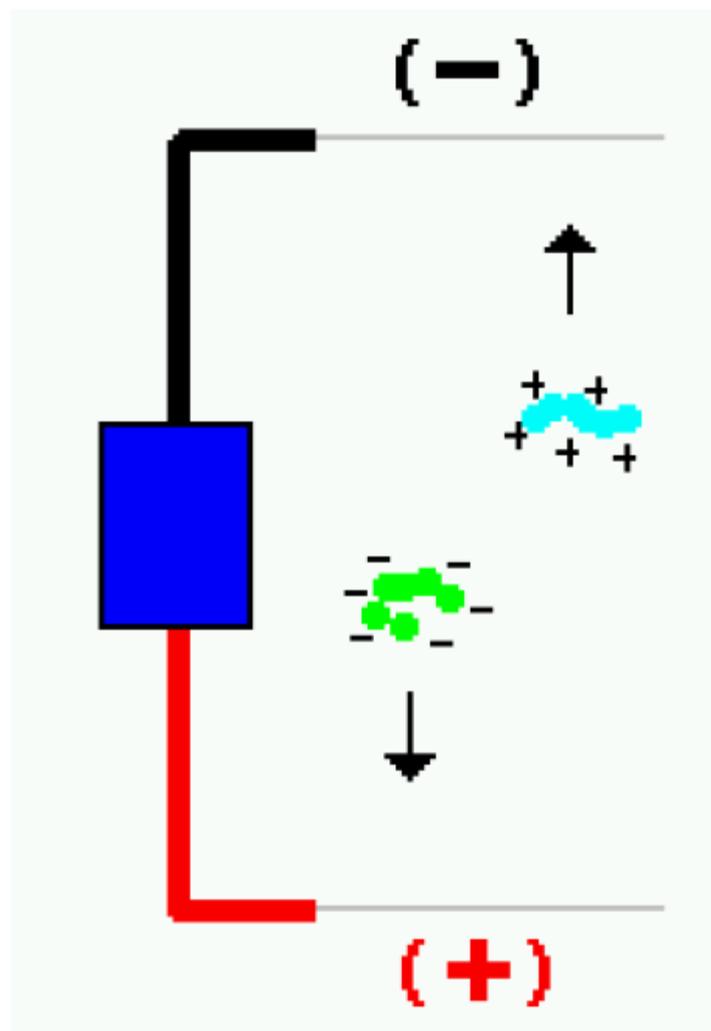


ELETROFORESE

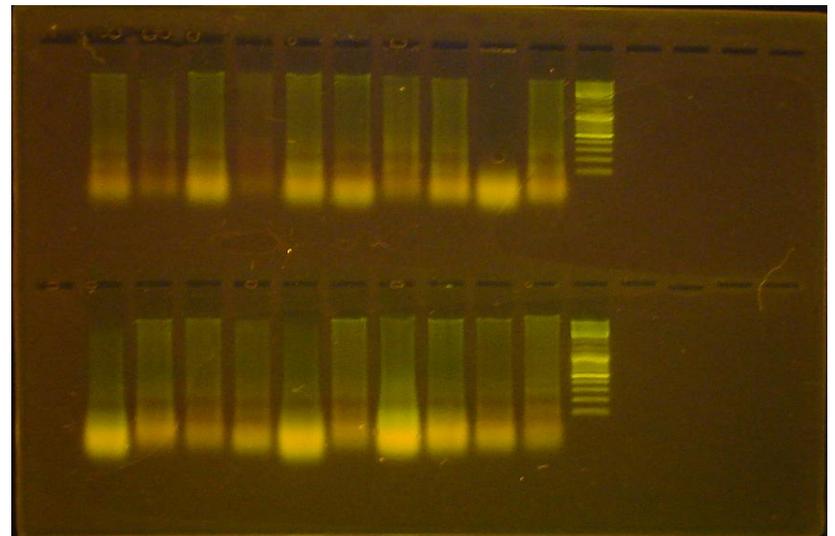
RAFAEL ALDRIGHI TAVARES
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL

- ✓ Técnica de separação de moléculas através de migração devido a um diferencial de potencial.
- ✓ Tamanho, formato, pH, carga
- ✓ Normalmente separar proteínas, DNA, RNA
- ✓ Eletroforese em Gel
- ✓ Eletroforese Capilar



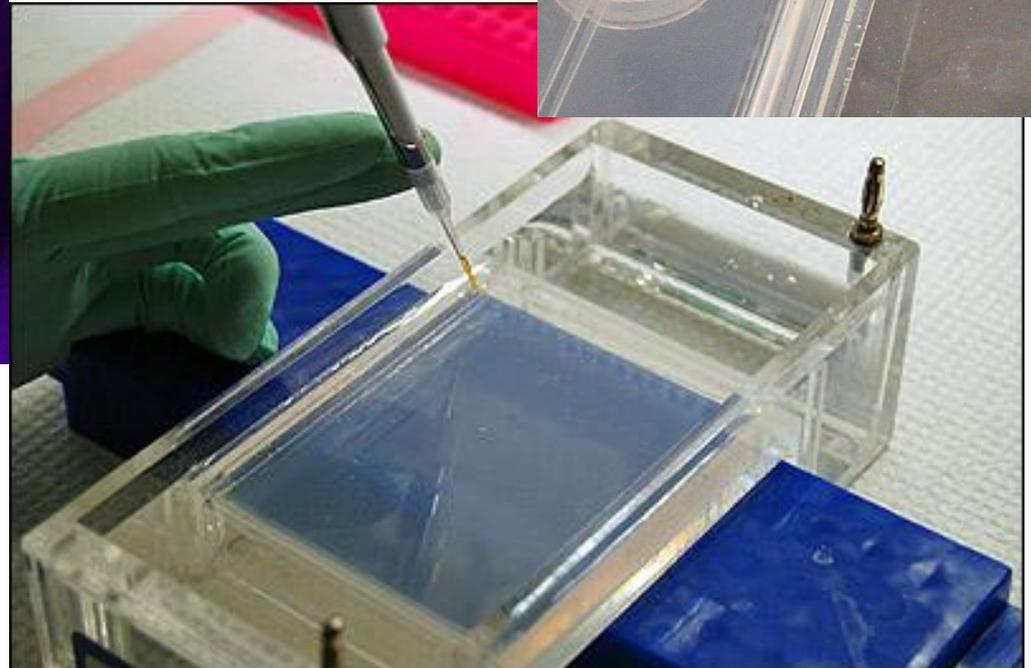
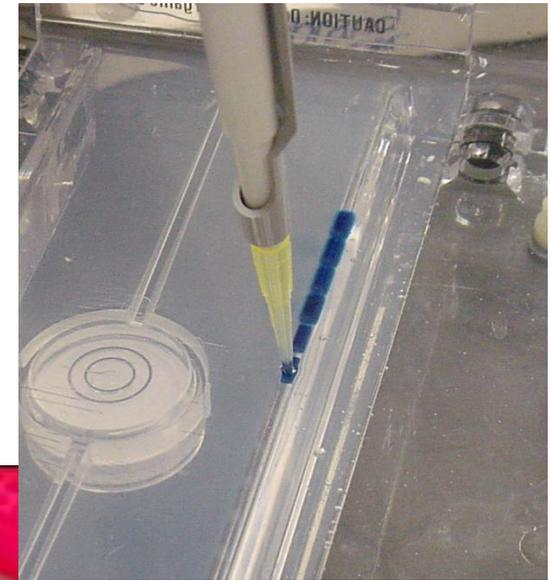
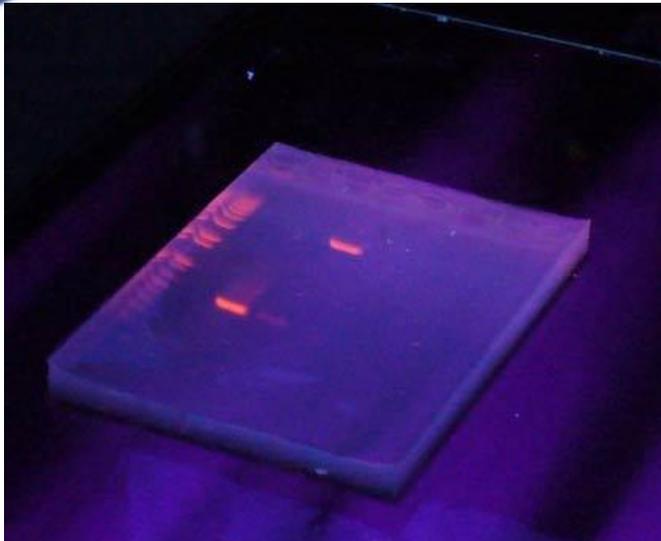


- ✓ Gel de Agarose
 - ✓ Polissacarídeo extraído de alga marinha
 - ✓ concentração 0,5 a 2%
 - ✓ Fácil de preparar
 - ✓ Não – tóxico
 - ✓ Baixa resolução
 - ✓ Voltagem
 - ✓ Horizontal



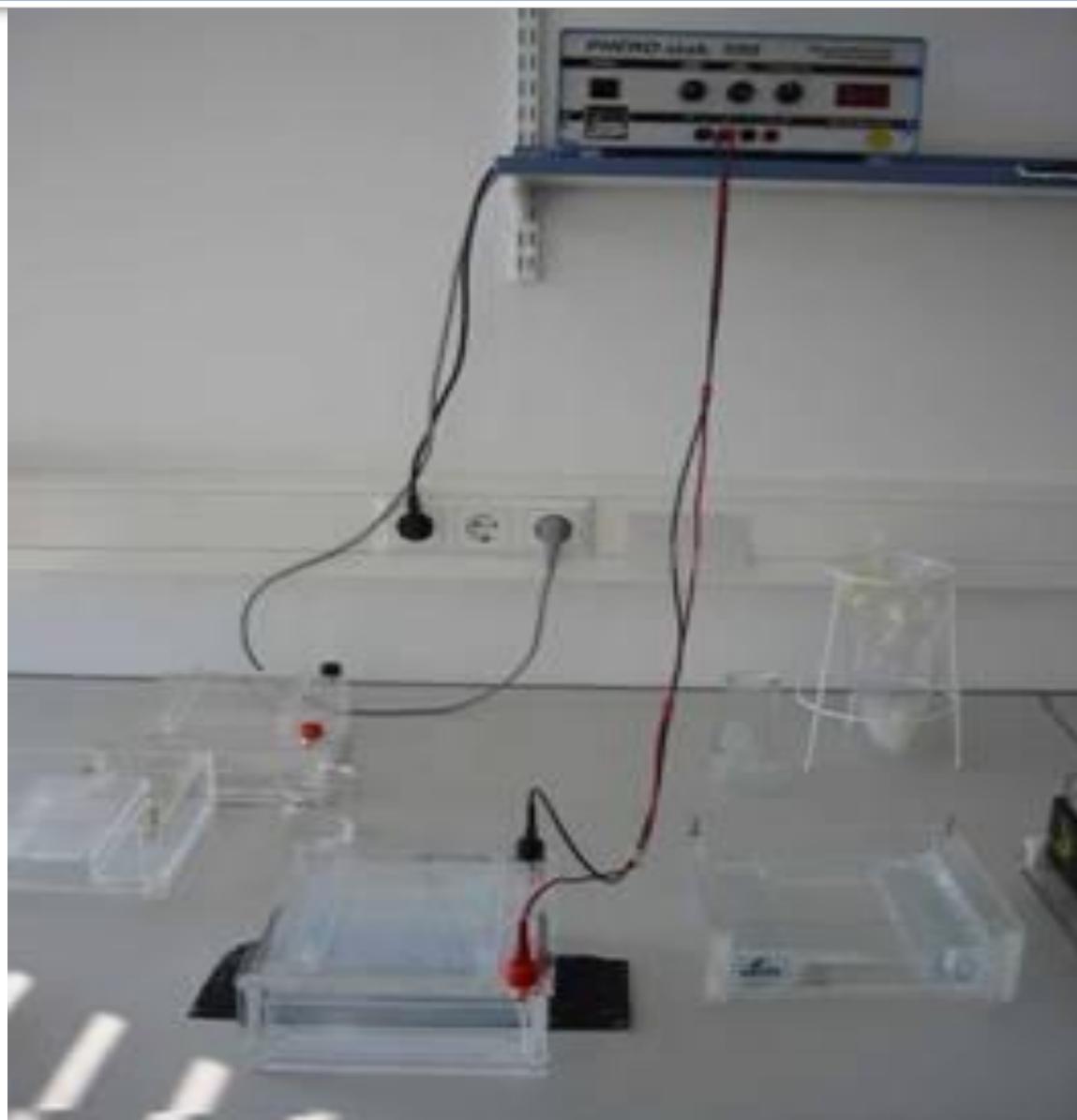
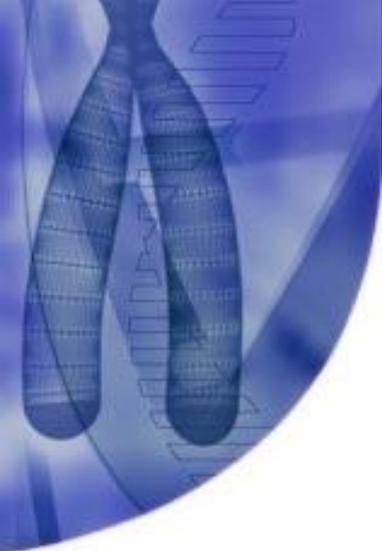
✓ Gel de Agarose

✓ Componentes e equipamentos



- Agarose
- Tampão
- Corante de DNA
- Buffer
- DNA/Marcador
- UV



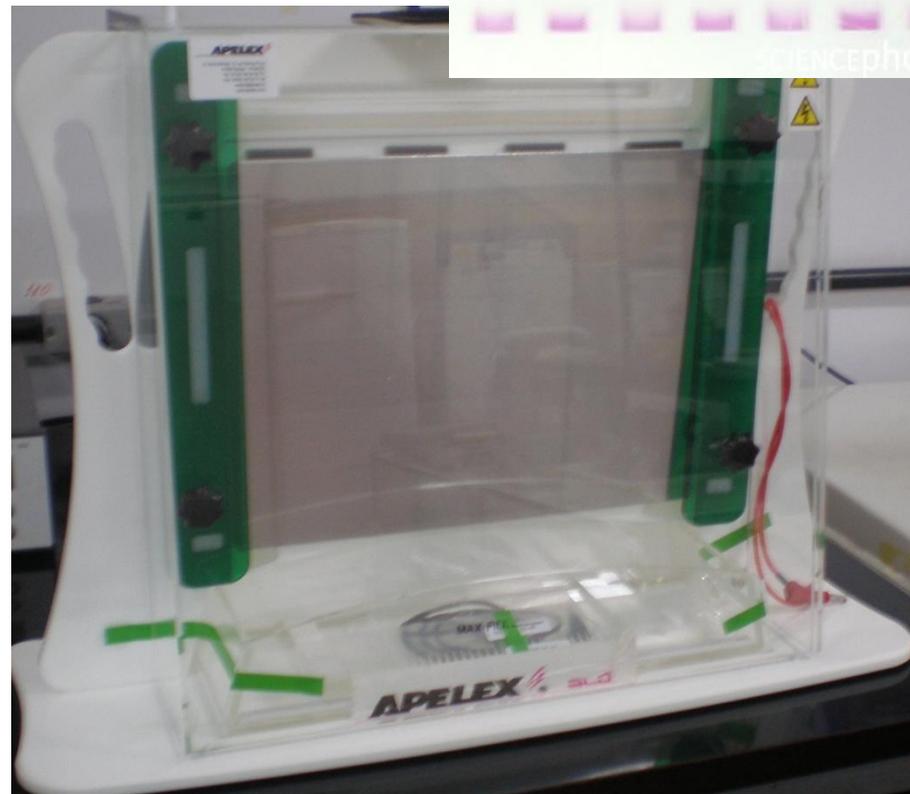
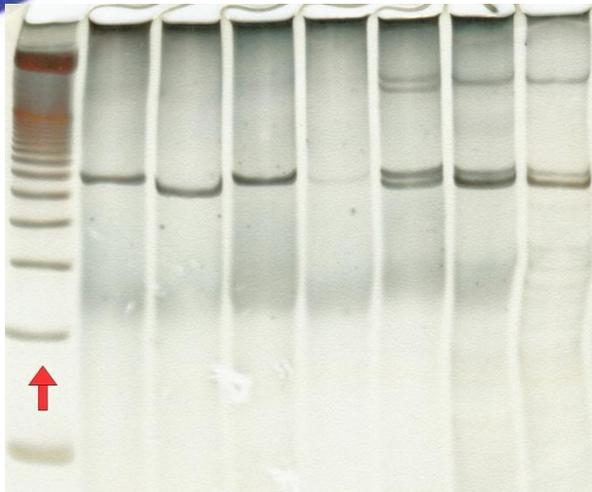
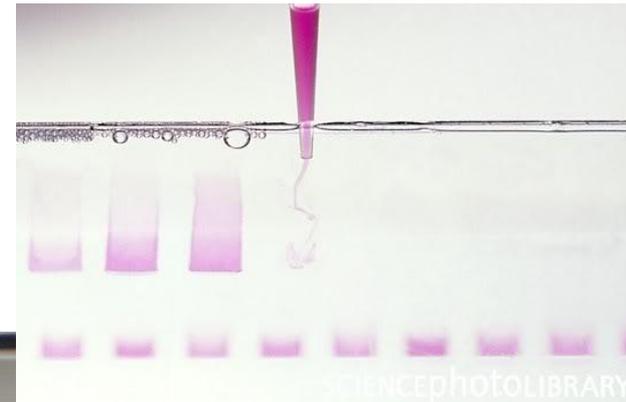


✓ Gel de Poliacrilamida

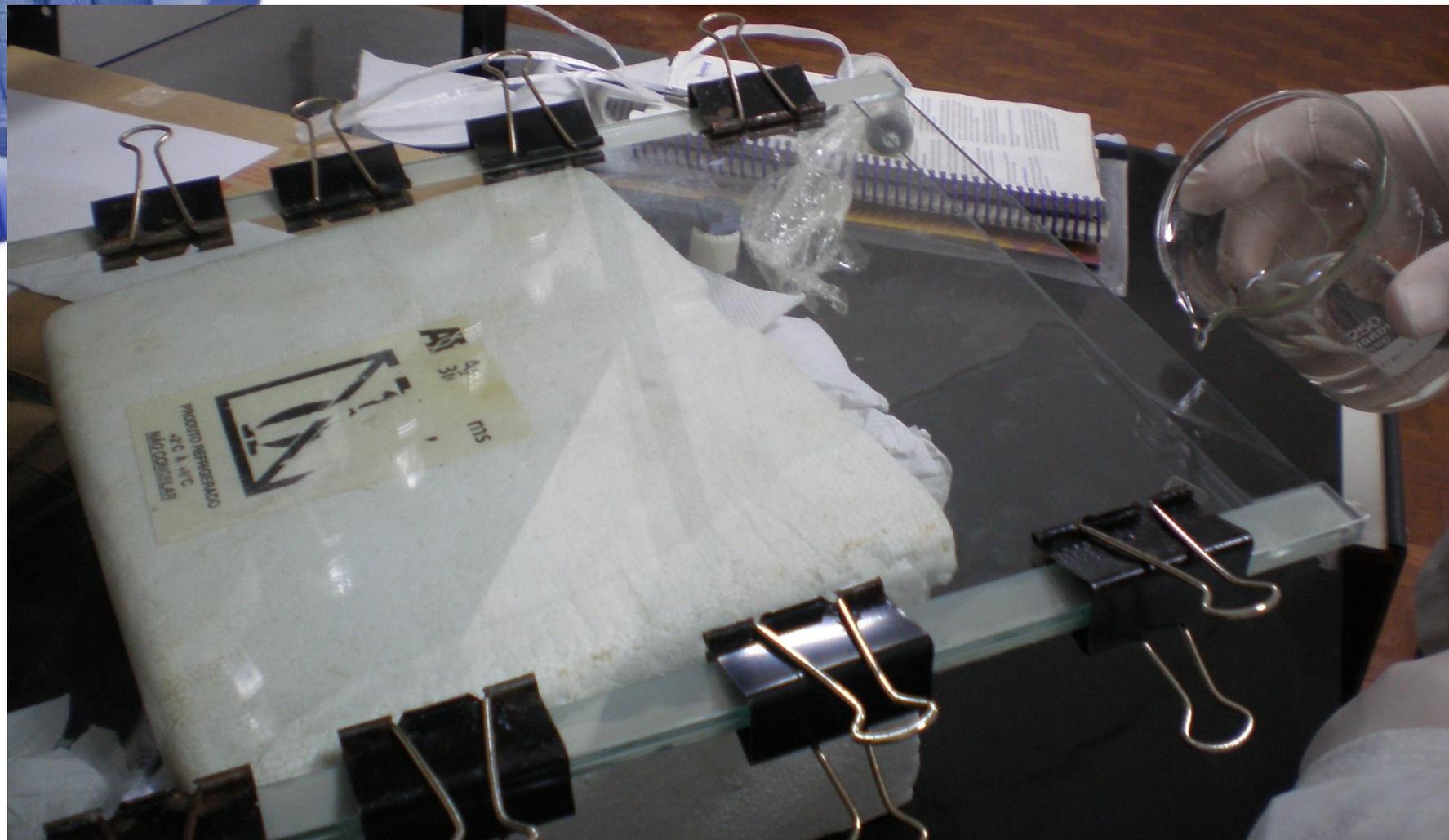
- ✓ Polímero de ligação cruzada de acrilamida e bisacrilamida
- ✓ concentração 3,5 a 20%
- ✓ Difícil de preparar
- ✓ Tóxico - Acrilamida
- ✓ Alta resolução
- ✓ Vertical
- ✓ Desnaturante



- ✓ Gel de Poliacrilamida
- ✓ Componentes e equipamentos



- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Tampão
- Corante de DNA
- Buffer
- DNA/Marcador



✓ Gel de Poliacrilamida Desnaturante

- ✓ Separação em fita simples
- ✓ Uréia
- ✓ Desnaturação 94°

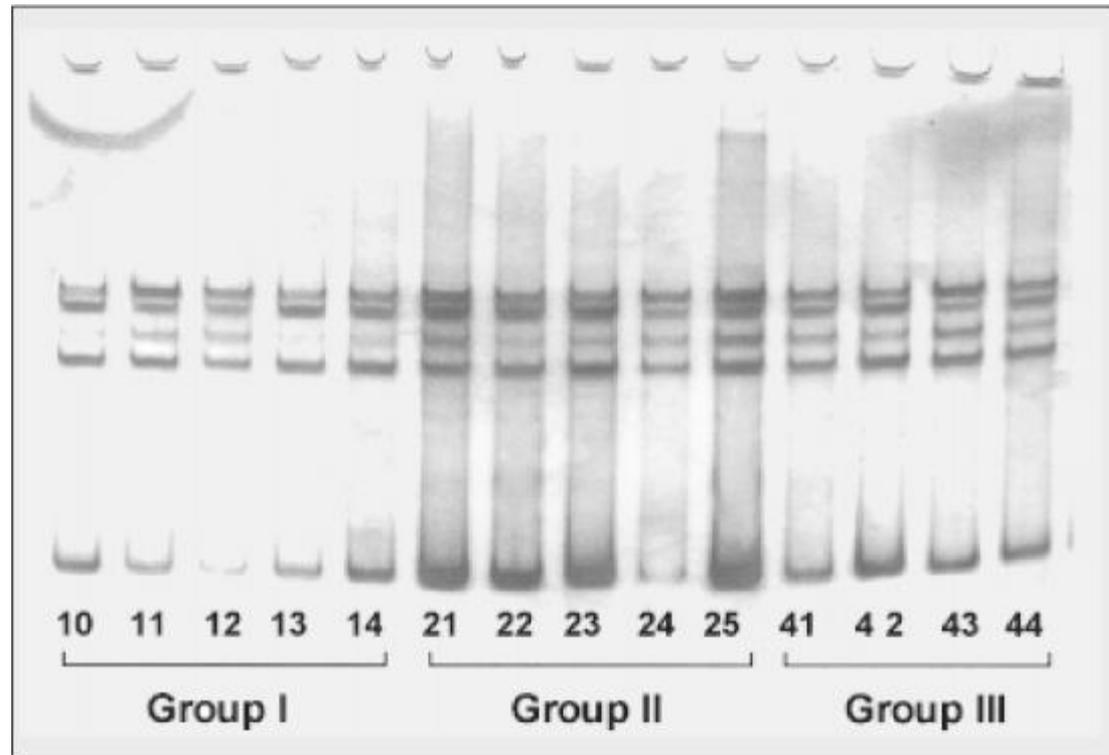
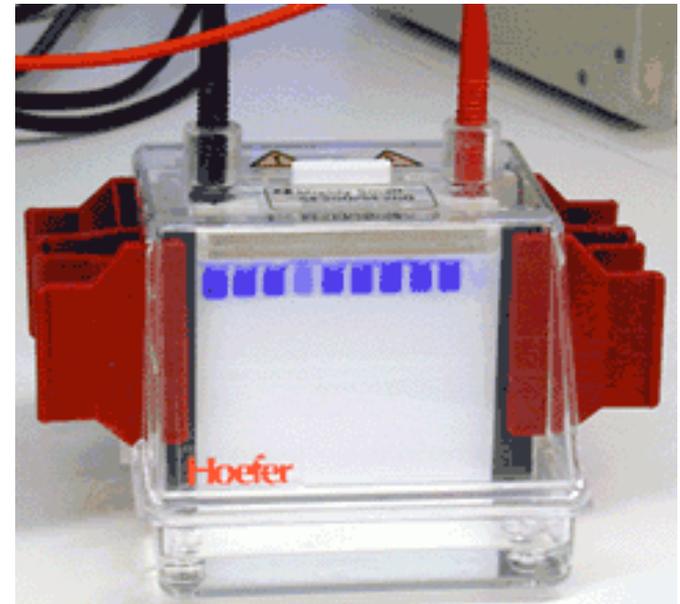
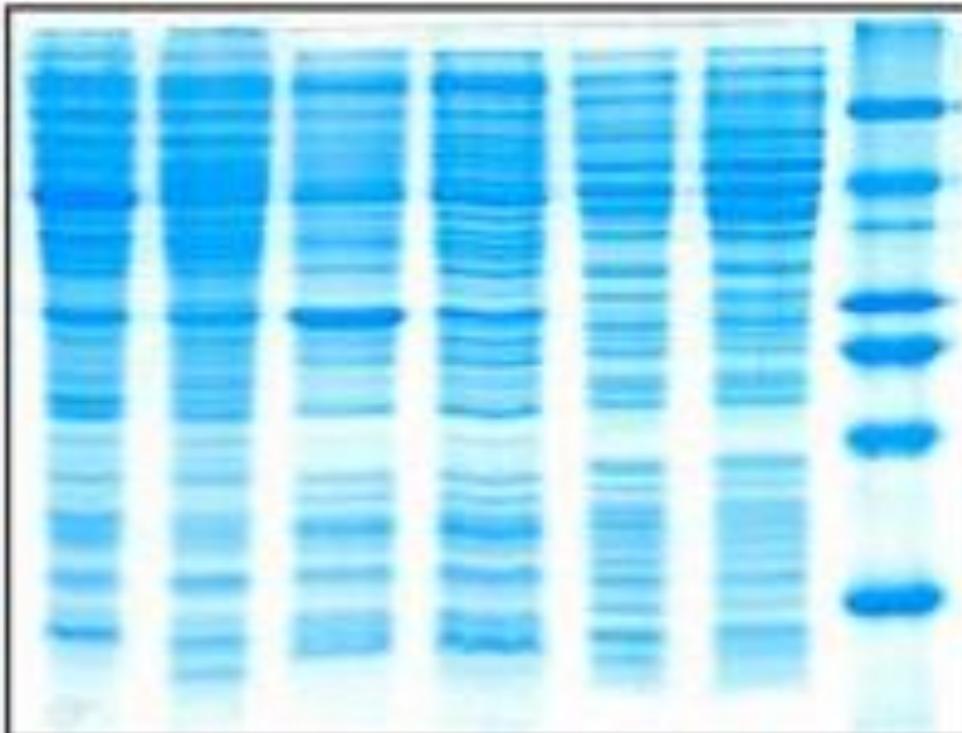


Figure 2 – PCR-SSCP showing no relevant alteration in a 7% polyacrylamide gel for exon 6 of tumor suppressor gene TP53 in group I (control, n = 5), group II (initiated, n = 5) and group III (initiated + pb, n = 4)

✓ Gel de SDS (SDS-PAGE)

- ✓ Poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio
- ✓ Proteínas
- ✓ Tamanho



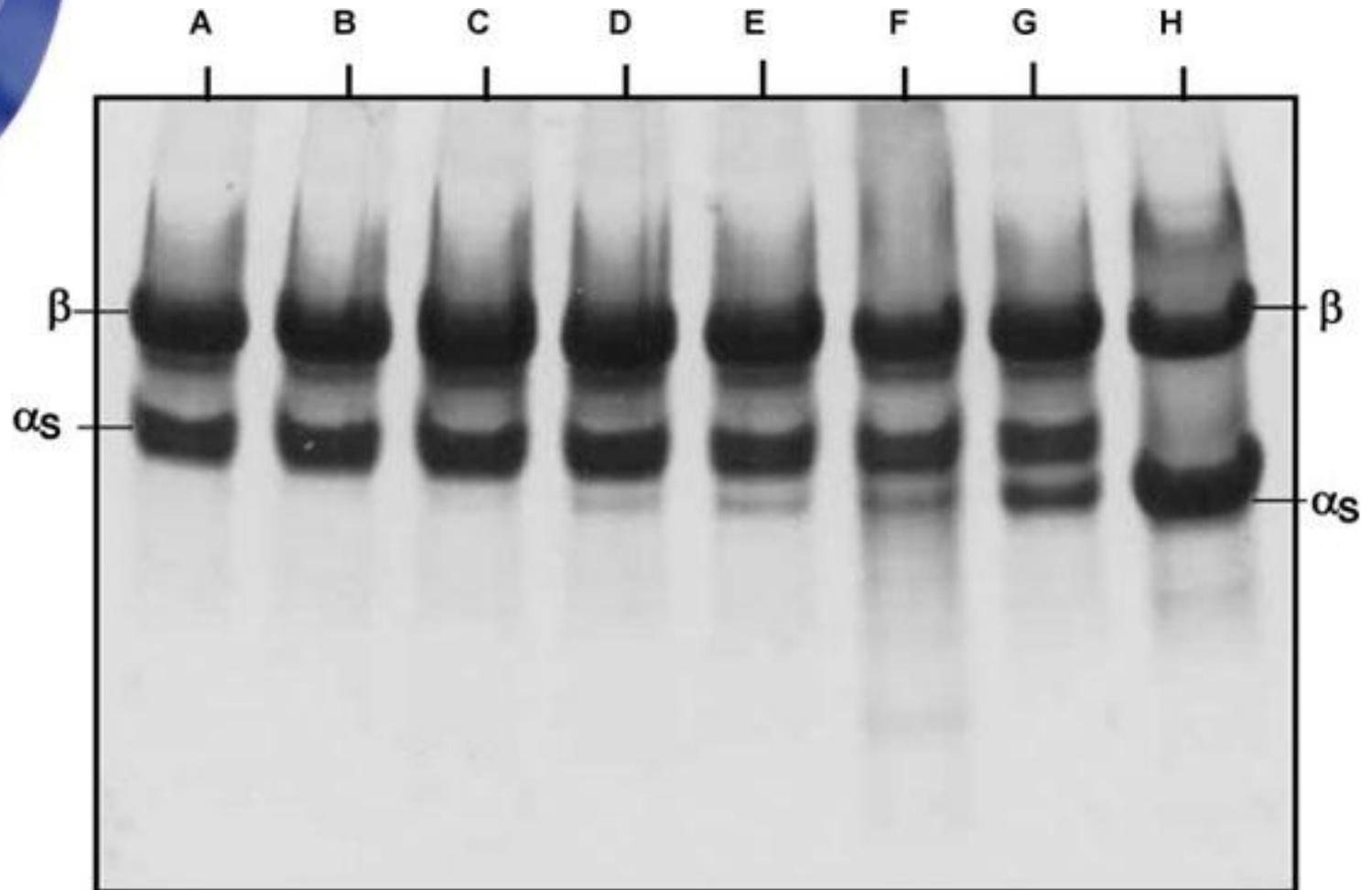
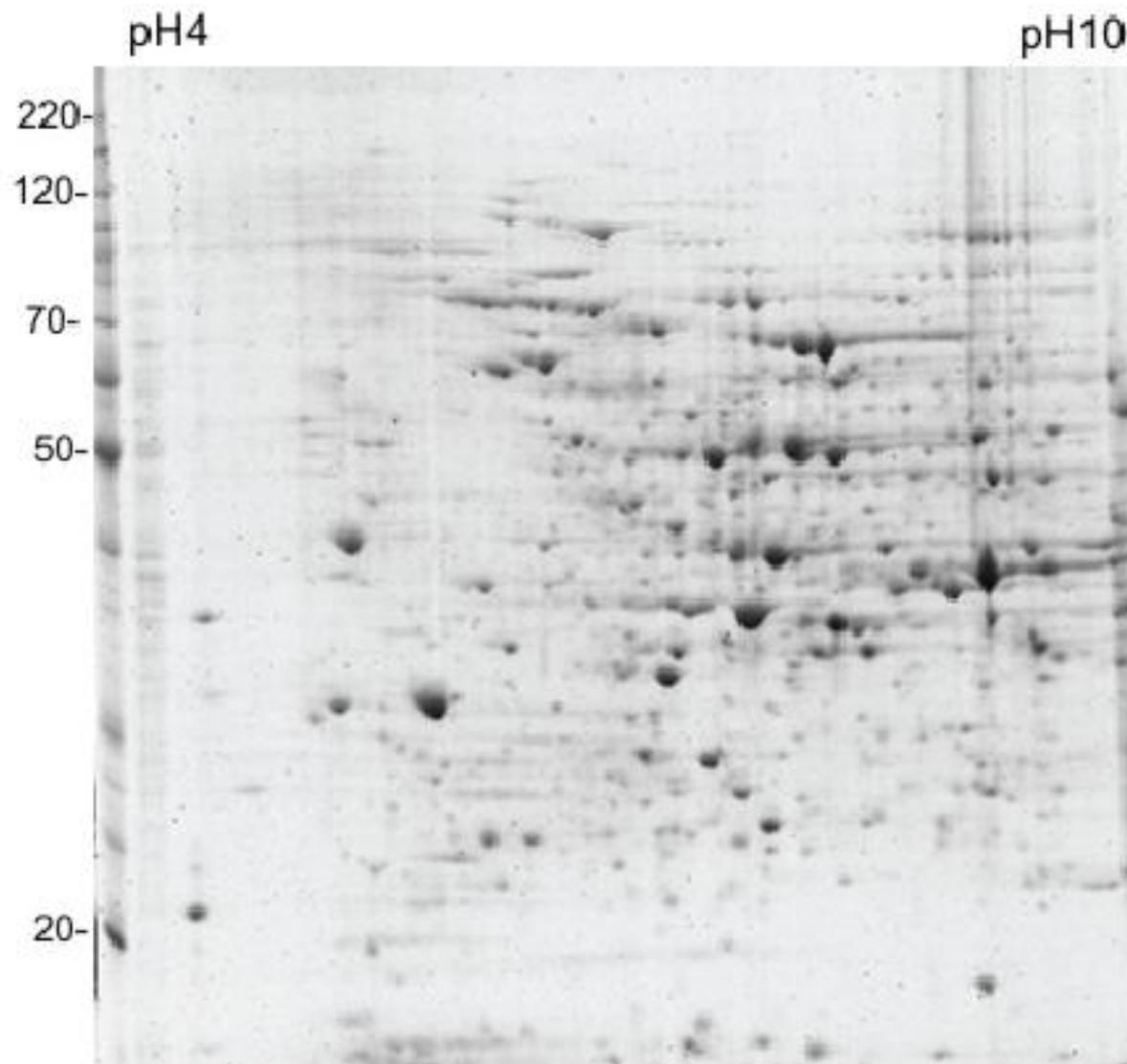


Figura 3. Perfil eletroforético (uréia-PAGE) da simulação de fraude do leite de cabra com leite de vaca. (A) 100% de leite caprino, (H)100% de leite bovino e misturas contendo 0,5 % (B), 1% (C), 2,5% (D), 5% (E), 10% (F), 25% (G) de leite bovino.

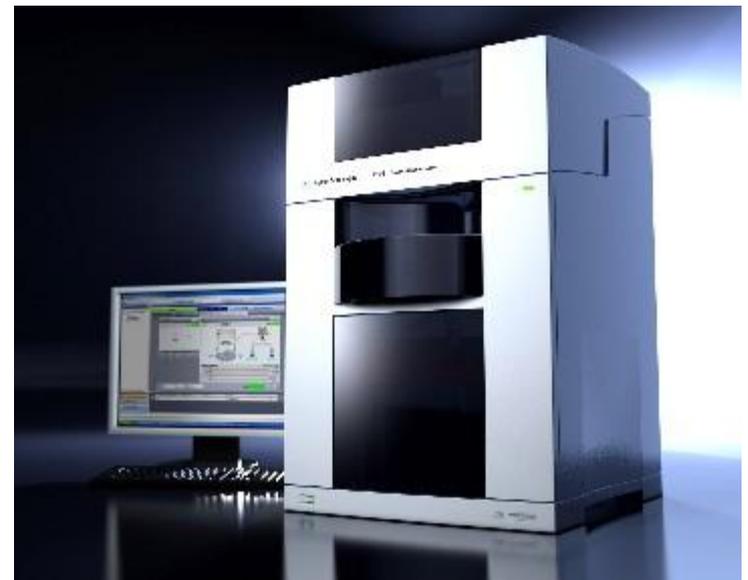
- ✓ Gel Bidimensional
 - ✓ Poliacrilamida
 - ✓ Proteínas
 - ✓ Massa molecular - Tamanho
 - ✓ Ponto isoelétrico – pH
 - ✓ 8.000 proteínas



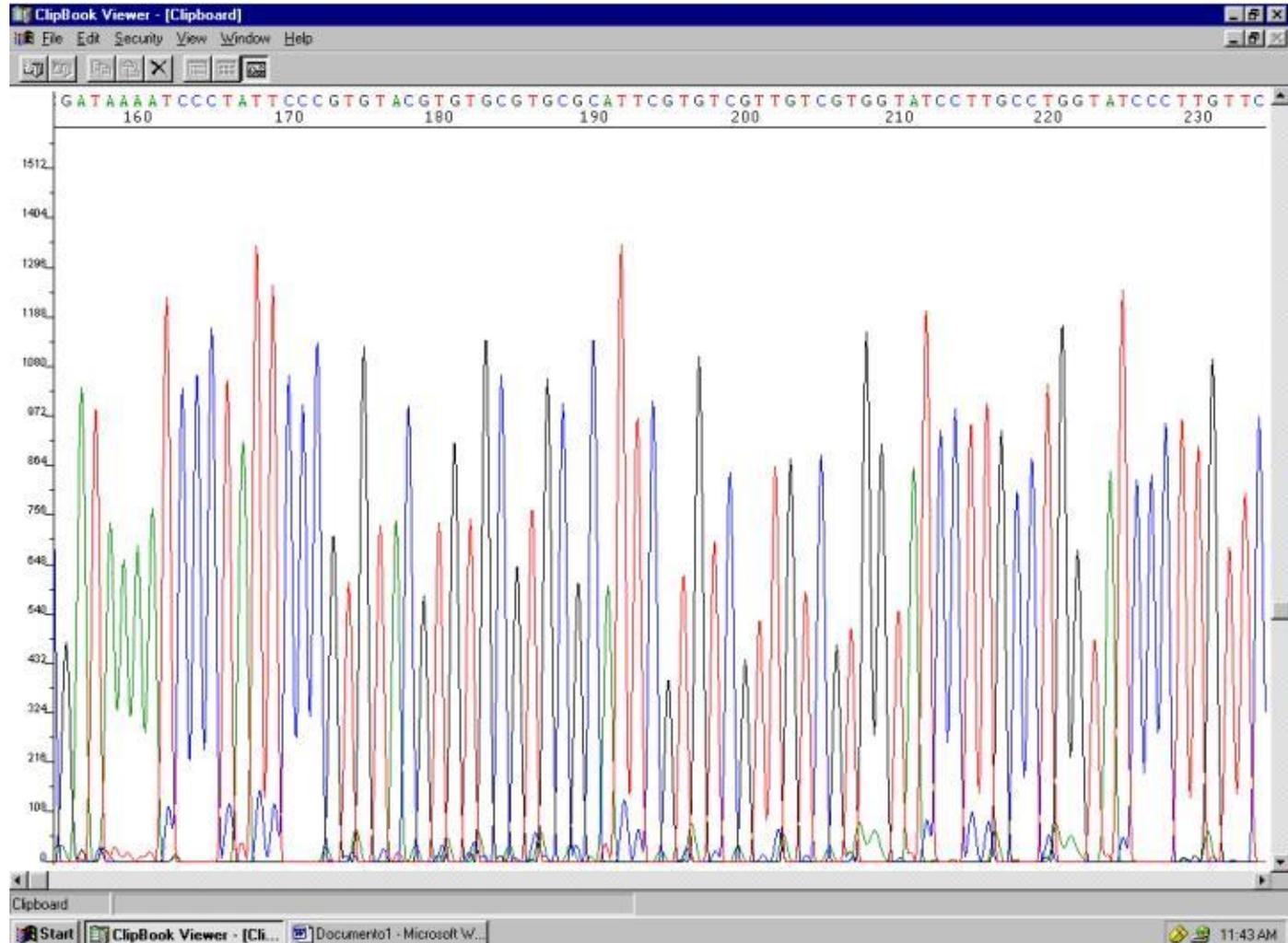


✓ **Eletroforese Capilar**

- ✓ Migração em alta velocidade
- ✓ Diminuição do efeito joule
- ✓ Grande Resolução
- ✓ Pouco volume de amostra
- ✓ Sequenciamento



✓ Eletroforese Capilar



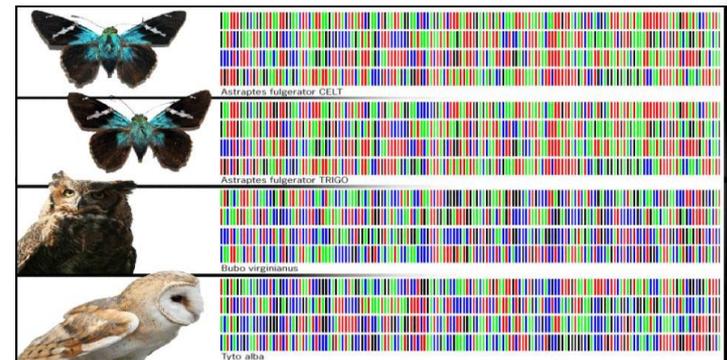
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



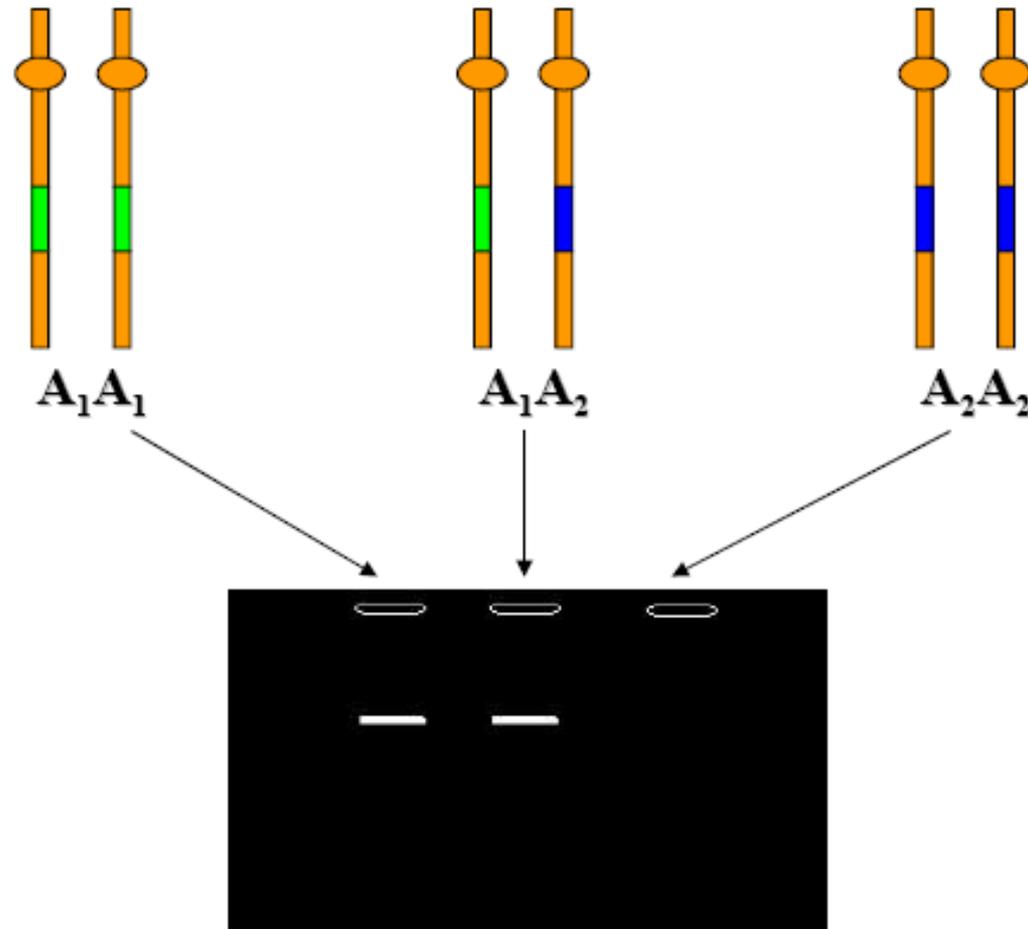
Marcadores Genéticos

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL

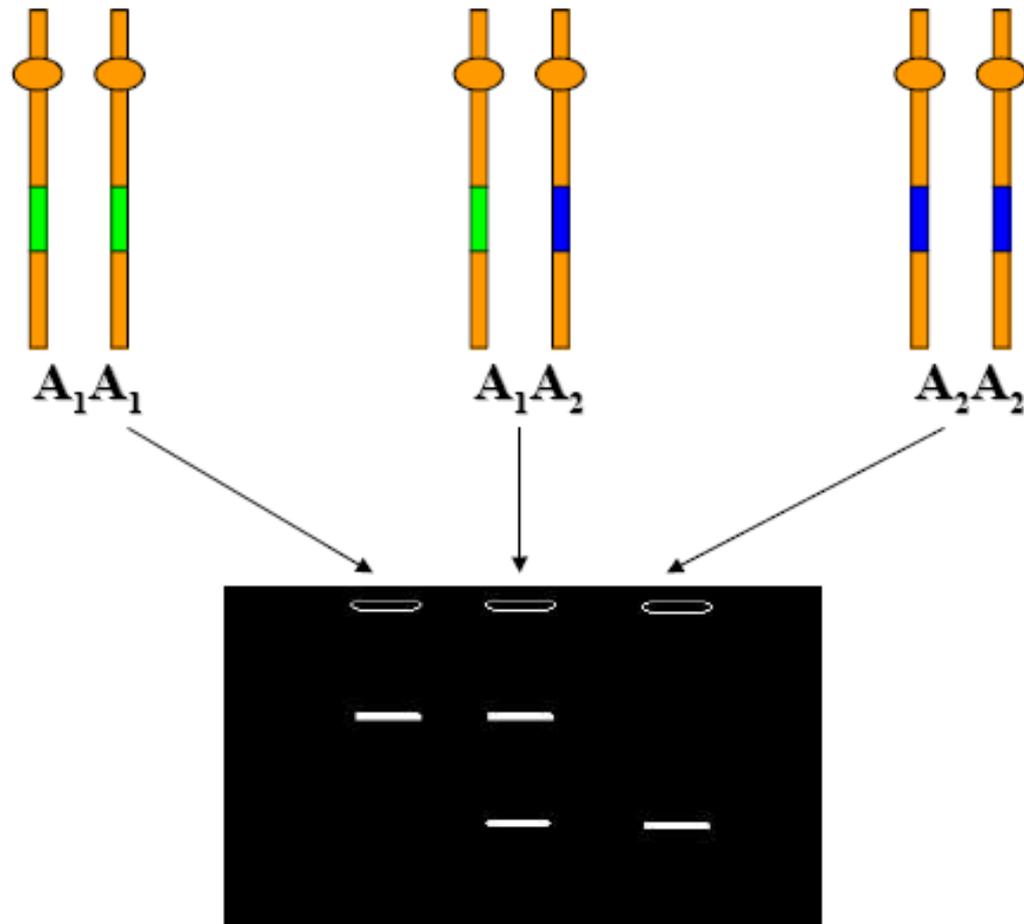
- ✓ Característica que é capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos.
 - ✓ capaz de diferenciar os progenitores.
 - ✓ reproduzido com precisão na progênie.
- ✓ Marcador genético (ou *locus* marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo.
 - ✓ alto nível de polimorfismo.
 - ✓ estabilidade em diferentes ambientes.
 - ✓ detectar grande número de *loci* não ligados.
 - ✓ de herança simples.
 - ✓ Codominante



✓ Dominantes



✓ codominantes



✓ Tipos de Marcadores Genéticos

✓ Marcadores Morfológicos

✓ Marcadores Moleculares

✓ Bioquímicos

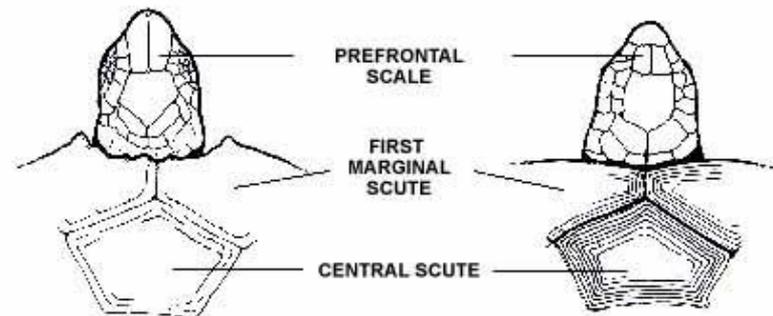
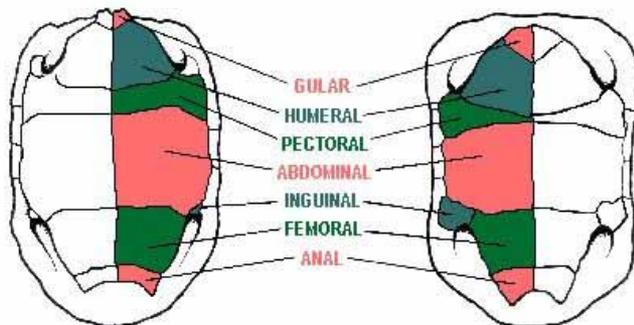
✓ Baseados em restrição e hibridação do DNA

✓ Baseados em amplificação do DNA



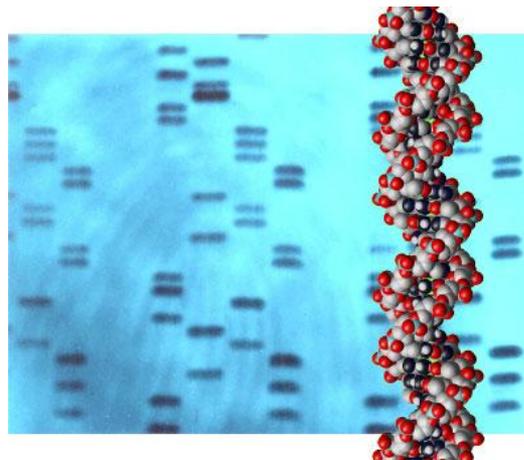
✓ Marcadores Morfológicos

- ✓ Genes associados a caracteres morfológicos, onde características fenotípicas de variação discreta são utilizadas como marcadores morfológicos.
- ✓ Fenótipos de fácil identificação visual.
- ✓ Identificado somente após a expressão do fenótipo.
- ✓ Difícil associação de um fenótipo a uma característica quantitativa (QT)



✓ Marcadores Moleculares

- ✓ Pontos de referência nos cromossomos.
- ✓ Todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma)
- ✓ Necessita de DNA e tecnologia mais avançada (Eletroforese, PCR)



✓ Marcadores Moleculares - Bioquímicos

✓ **Isoenzimas**

✓ Definidas como diferentes formas moleculares variantes) de uma mesma enzima, apresentando função idêntica ou similar, presente num mesmo indivíduo.

✓ Presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas

✓ Diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de sequências de DNA que codificam tais enzimas.



✓ Marcadores Moleculares - Bioquímicos

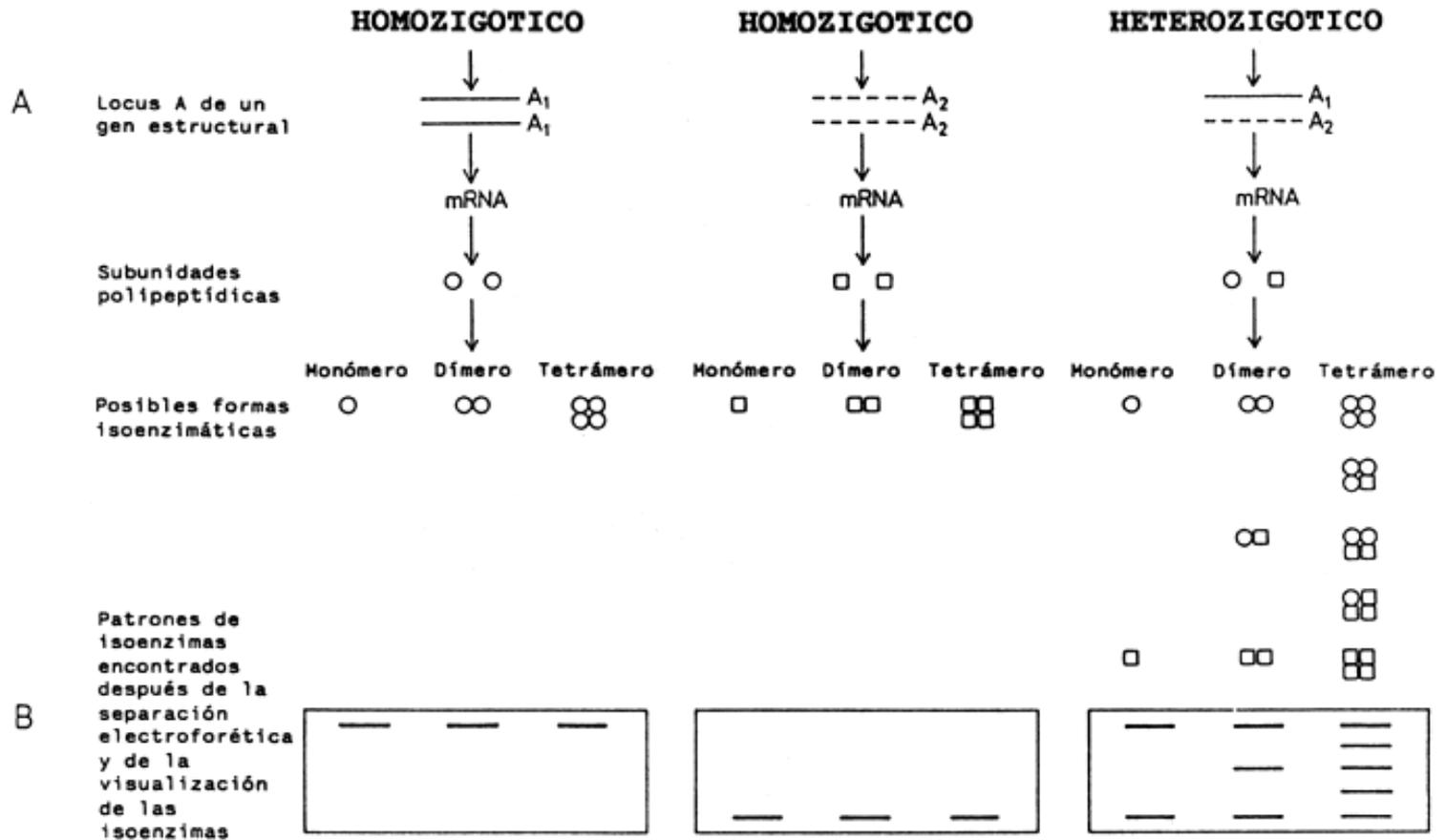
✓ Isoenzimas

Deteção

- Extração de proteínas do tecido vegetal.
 - Separação destas proteínas através de eletroforese.
 - Coloração histoquímica do gel.
-
- 

✓ Marcadores Moleculares - Bioquímicos

✓ Isoenzimas



✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ **RFLPs - *Restriction Fragment Length Polymorphism***

✓ Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

✓ Enzimas de restrição.

✓ As variações nos nucleotídeos do DNA devido a mutação, deleção, inserção e inversão, podem ser detectadas se ocorrerem num sítio de corte das enzimas de restrição.

✓ Clonagem de genes e mapeamento de QTLs

✓ Elevado custo e o tempo

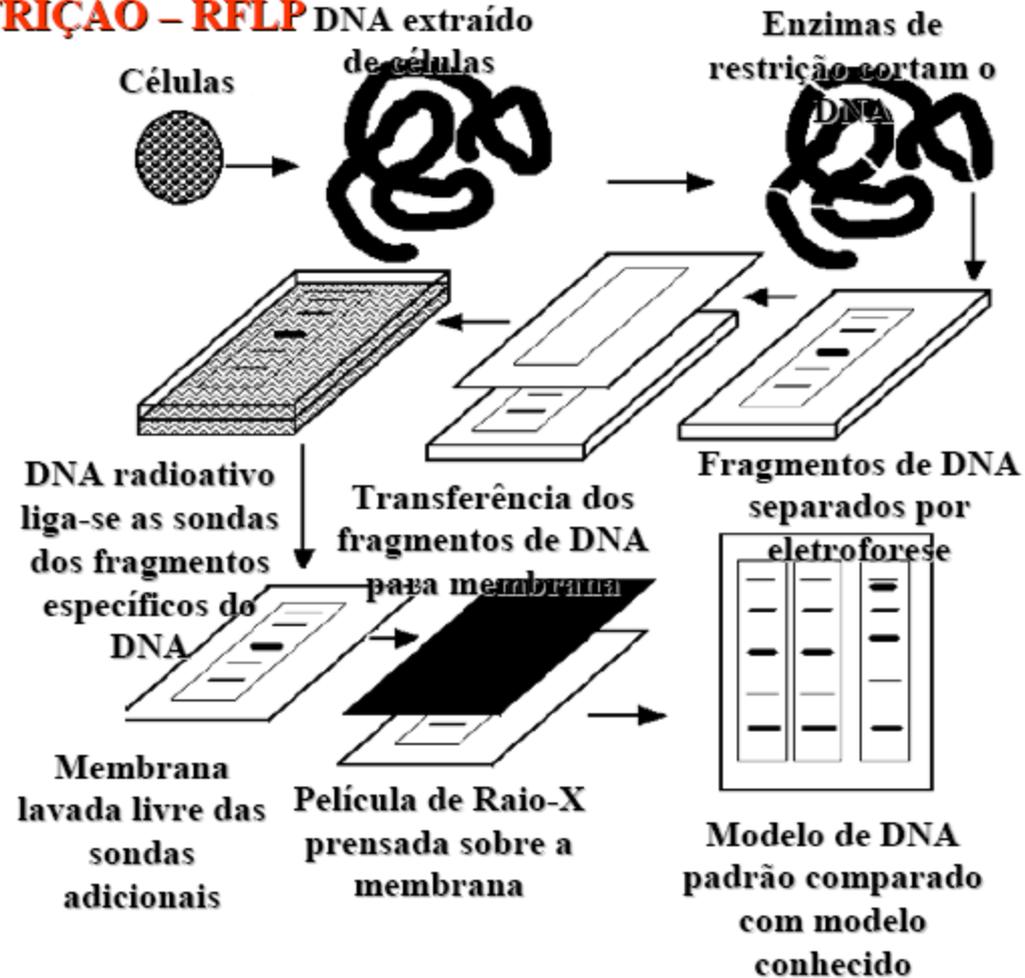
✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ **RFLPs**

Detecção

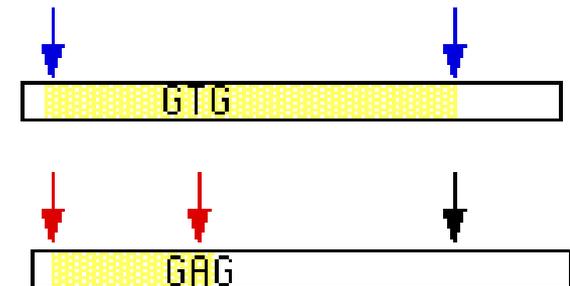
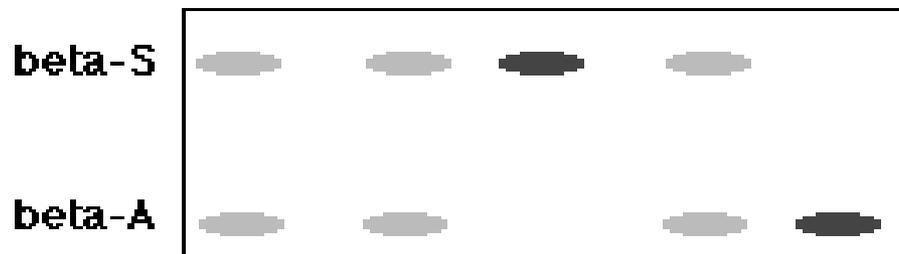
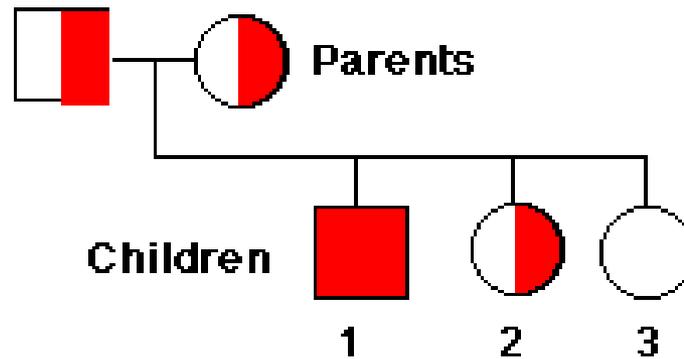
- Extração de DNA.
 - Digestão.
 - Eletroforese.
 - Desnaturação.
 - Southern blot (Sonda).
 - Hibridização.
 - Autoradiografia.
-

POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO – RFLP



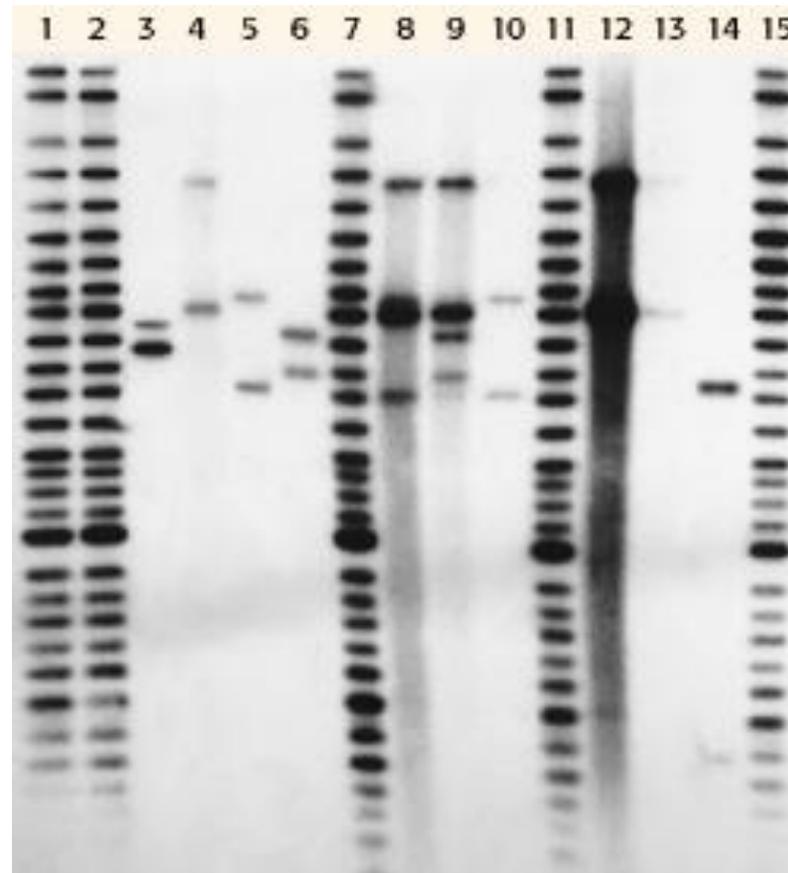
✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ RFLPs



✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ RFLPs



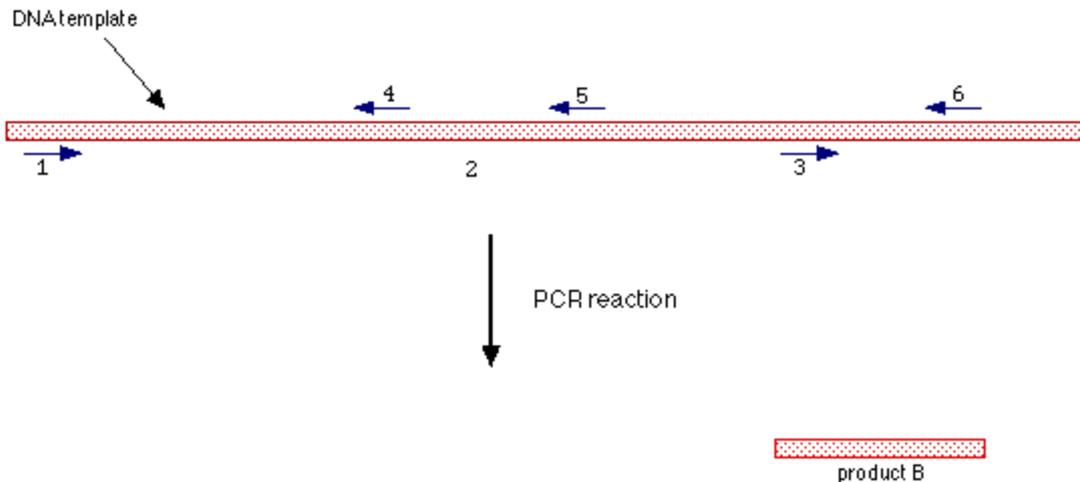
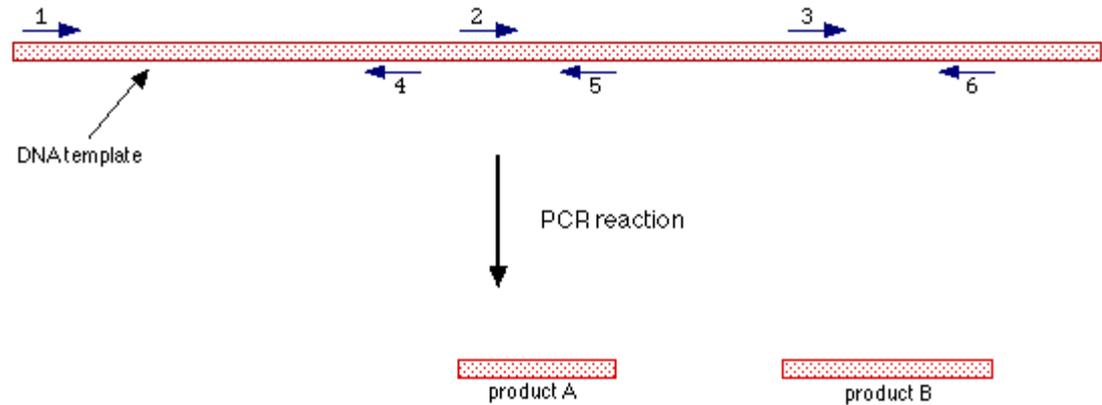
✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **RAPD - *Randomly Amplified Polymorphic DNA***

- ✓ Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso.
 - ✓ PCR.
 - ✓ *Primers* arbitrários e curtos.
 - ✓ Sem conhecimento prévio do produto.
 - ✓ Mutação de ponto no sítio de pareamento do *primer*.
 - ✓ *Simples, rápida e de baixo custo.*
 - ✓ *Dominante*
-

✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

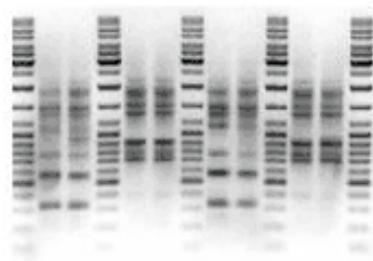
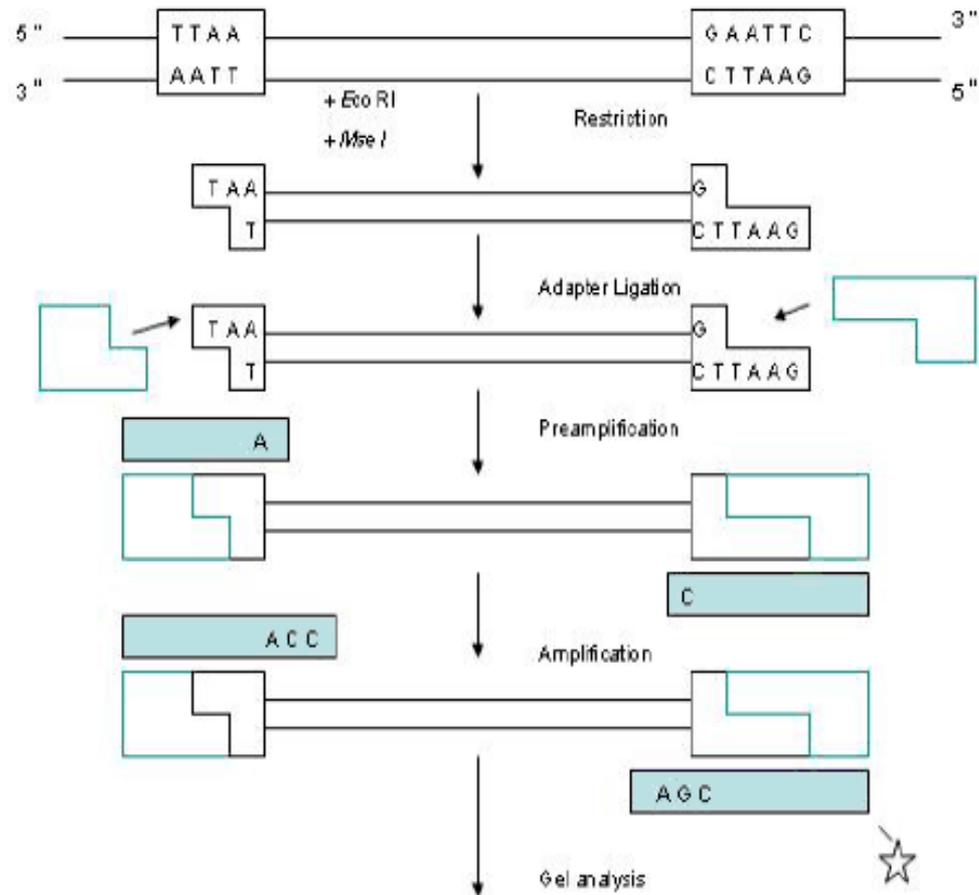
✓ **RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA**



✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)**

- ✓ Polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados.
 - ✓ Restrição por enzima e PCR.
 - ✓ Alta especificidade e resolução.
 - ✓ Dominante.
 - ✓ Elevado custo e mão de obra.
-
- 

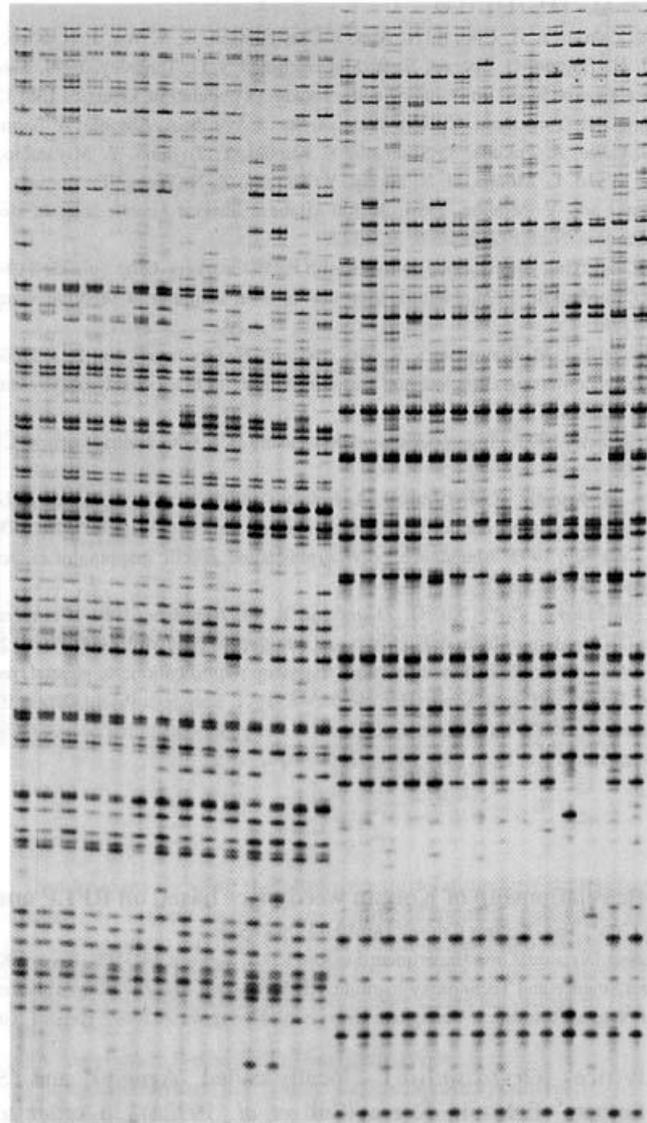




92S04/02G12

93B11/02F06

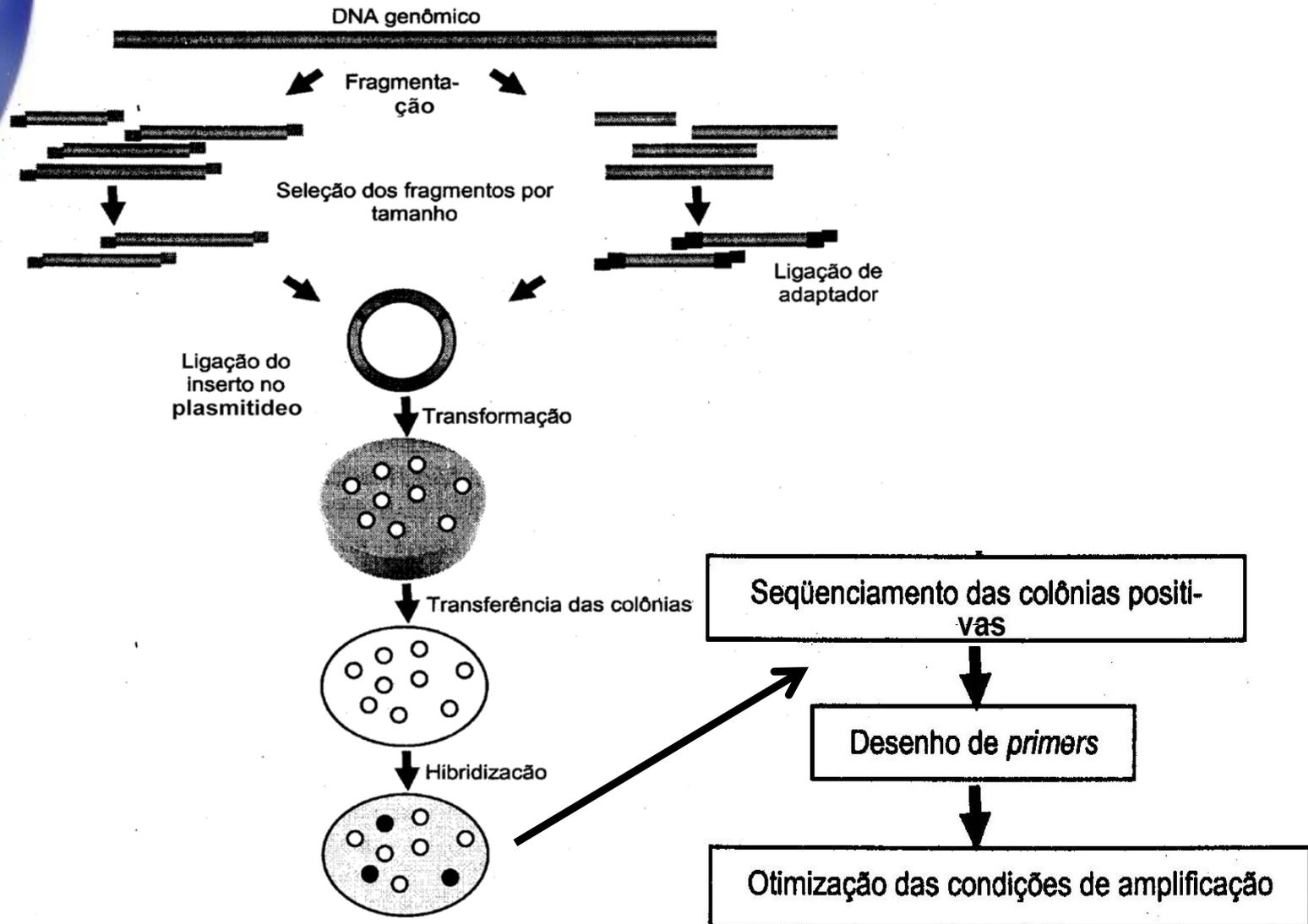
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **Microssatélites**

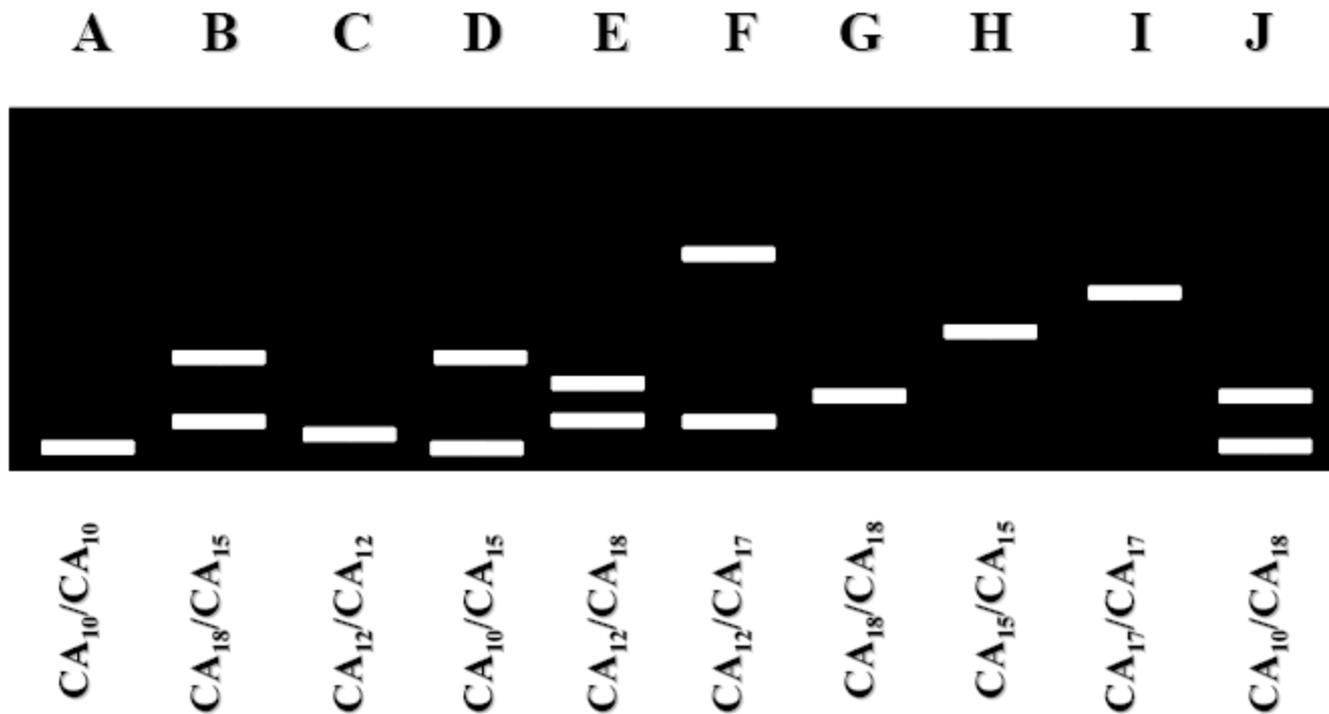
- repetições curtas em tandem (STR - '*Short Tandem Repeat*')
 - codominante.
 - Alto grau de informação de polimorfismo por *locus* gênico.
 - Distribuição aleatória por todo o genoma podendo estar associado a regiões expressas.
 - Alta conservação entre espécies relacionadas.
 - Dependentes de pouca quantidade de DNA na amostra.
-

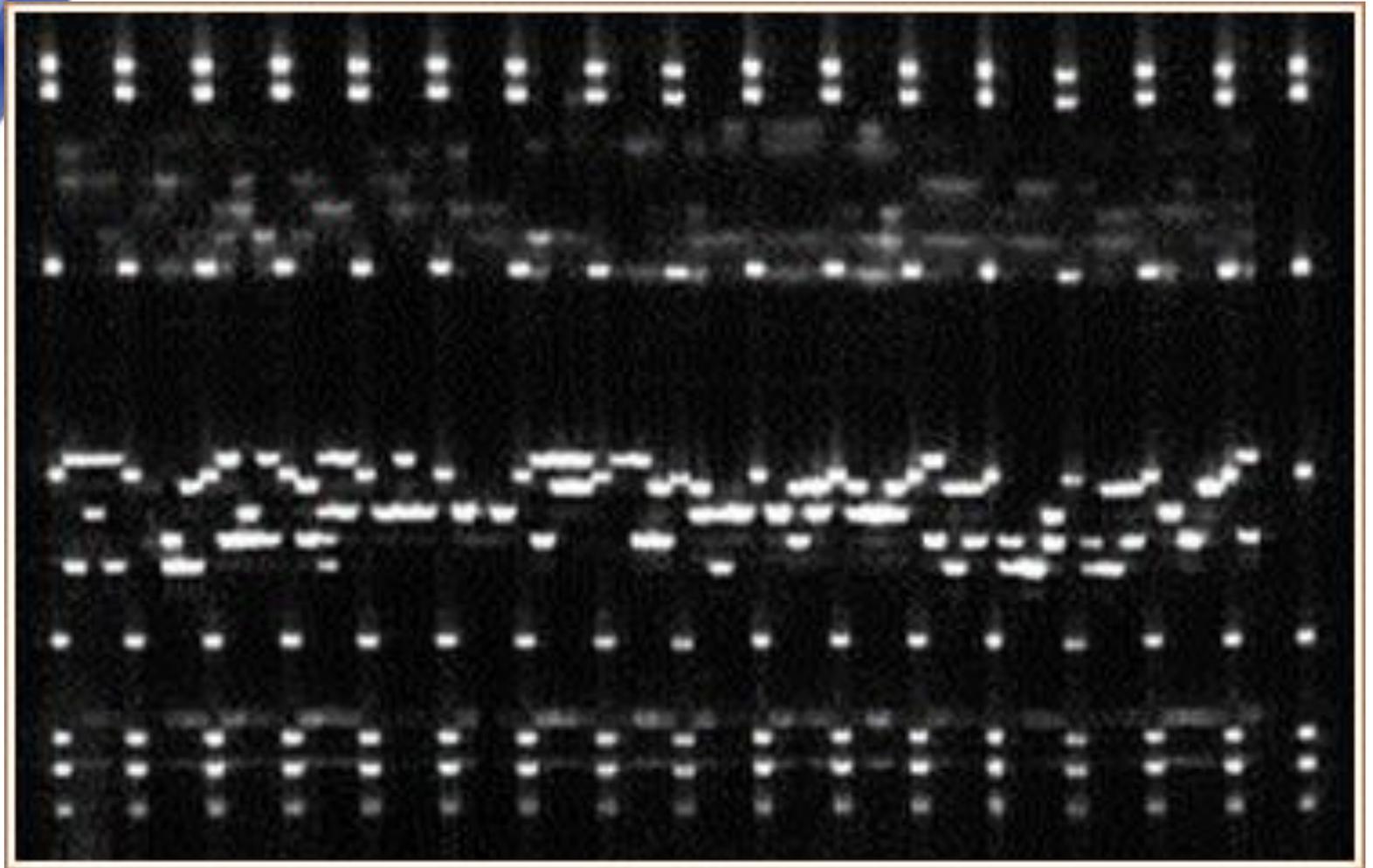


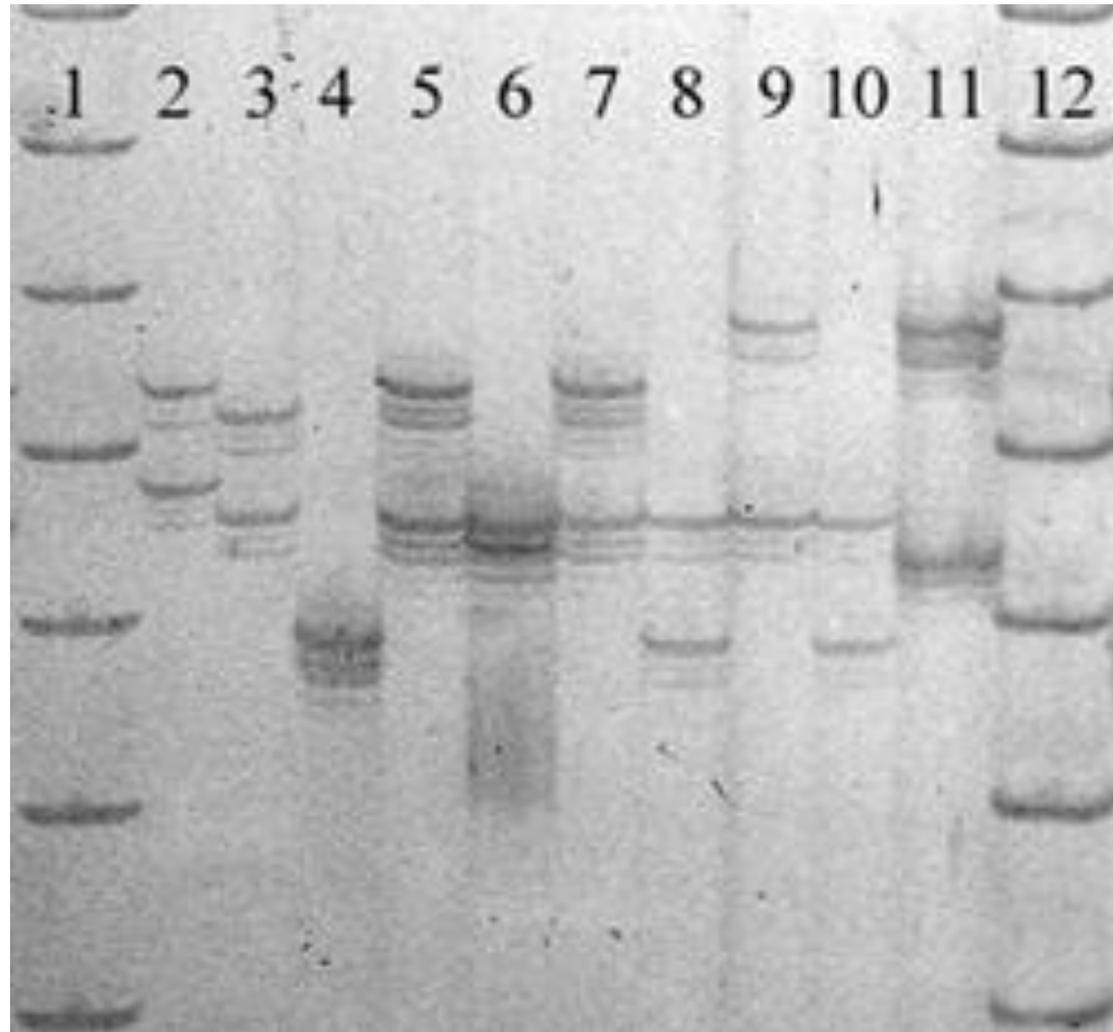
✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **Microssatélites**

➤ Multialélico







✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **SNPs**

➤ Polimorfismo de nucleotídeo simples

➤ Alteração de uma única base

➤ 1% da população

➤ Bi-alélica

➤ regiões expressas ou não-expressas

➤ Genética de populações, filogenia, mapas genéticos

✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ SNPs

seq_1 (A) ATGCGGC**G**ATTGCCATGGGTA

seq_2 (A) ATGCGGC**G**ATTGCCATGGG**AA**

seq_3 (A) ATGCGGC**G**ATTGCCATGGGTA

seq_1 (B) ATGCGG**CA**ATTGCCATGGGTA

seq_2 (B) ATGCGG**CA**ATTGCCATGGG**T**

seq_3 (B) ATGCGG**CA**ATTGCCATGGGTA

Contig ATGCGGC**G**ATTGCCATGGGTA

SNP ↑

↑ ↑

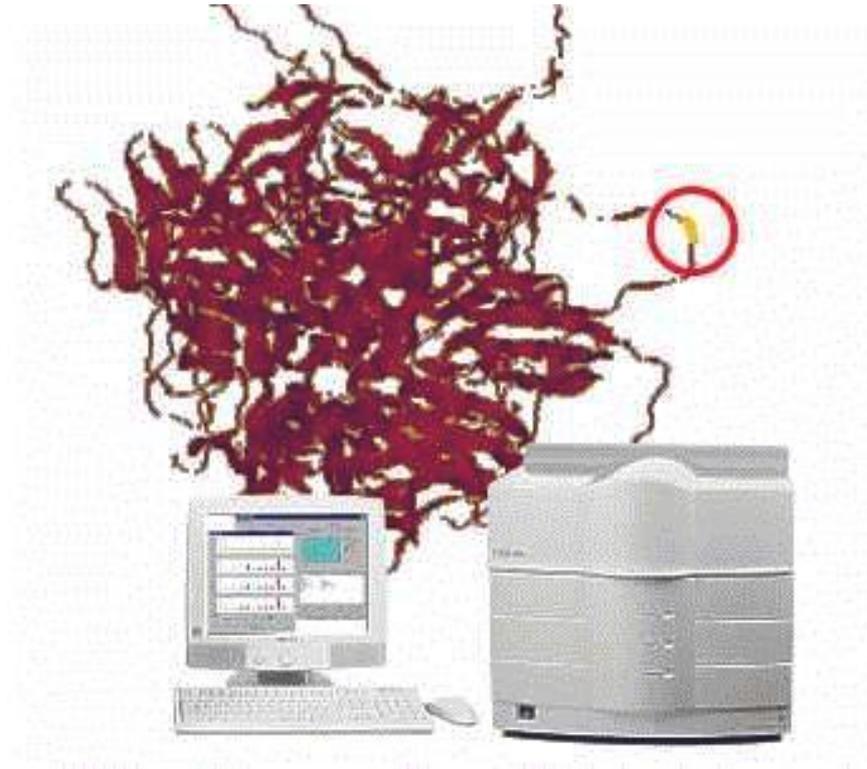
sequencing errors or paralogs

✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ SNPs

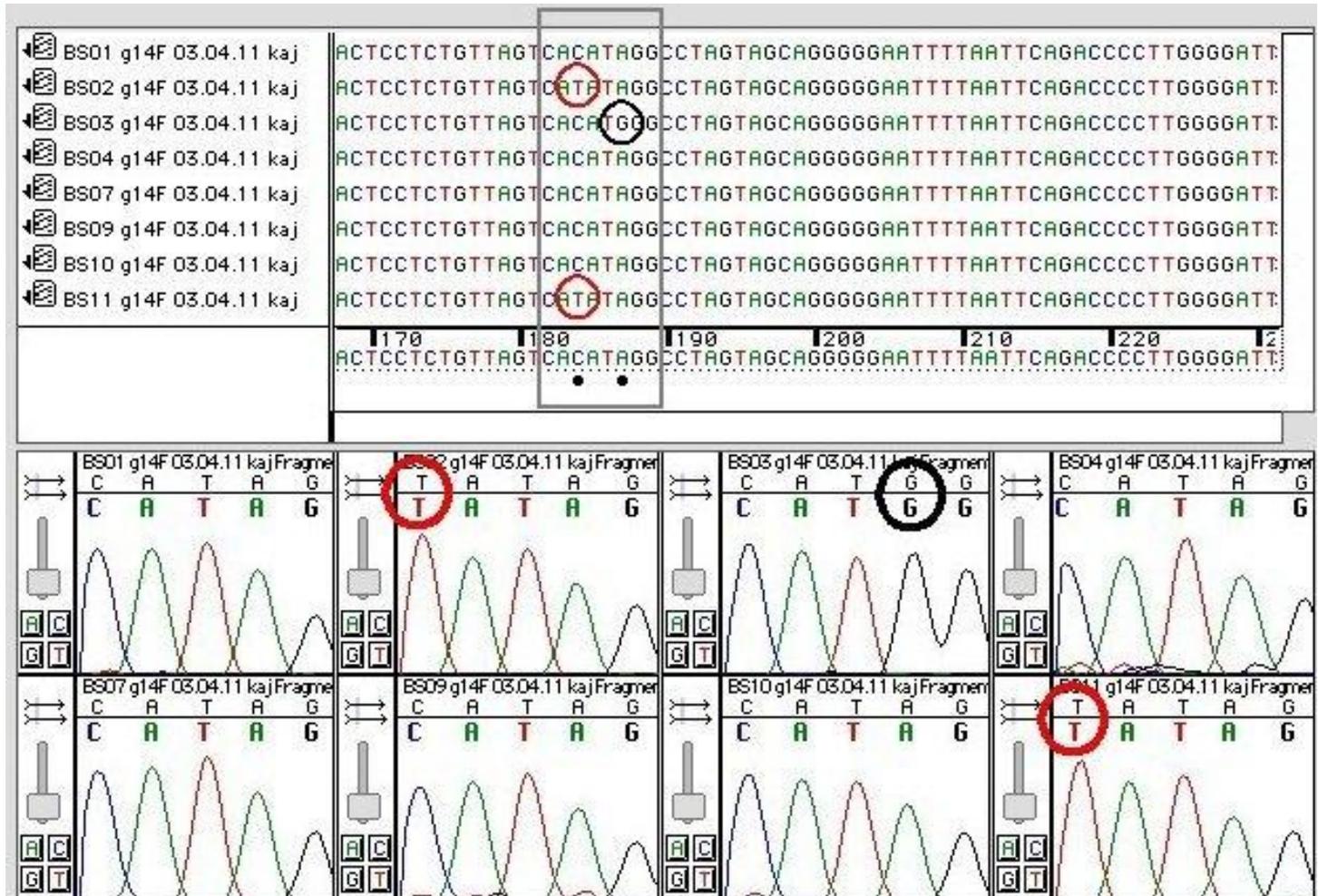
➤ *Sequenciamento*

➤ *Bioinformática*

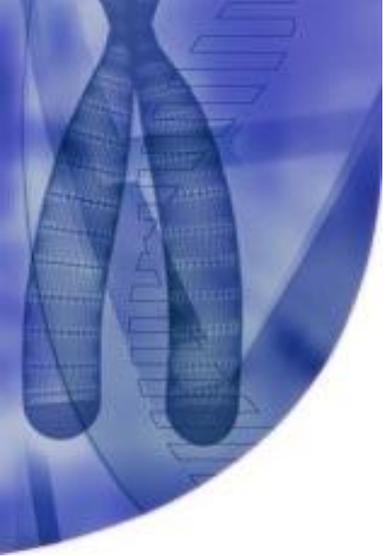


✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ SNPs



- ✓ Conceitue:
 - ✓ PCR
 - ✓ DNA Polimerase
 - ✓ Inicializadores (*Primers*)
 - ✓ dNTPS
 - ✓ DNA *Template*
- ✓ Descreva o ciclo da reação da PCR (Etapas e Temperaturas)
- ✓ Como é realizado a verificação do produto da PCR?
- ✓ Objetivos da técnica de PCR?



✓ **Obrigado**

