

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

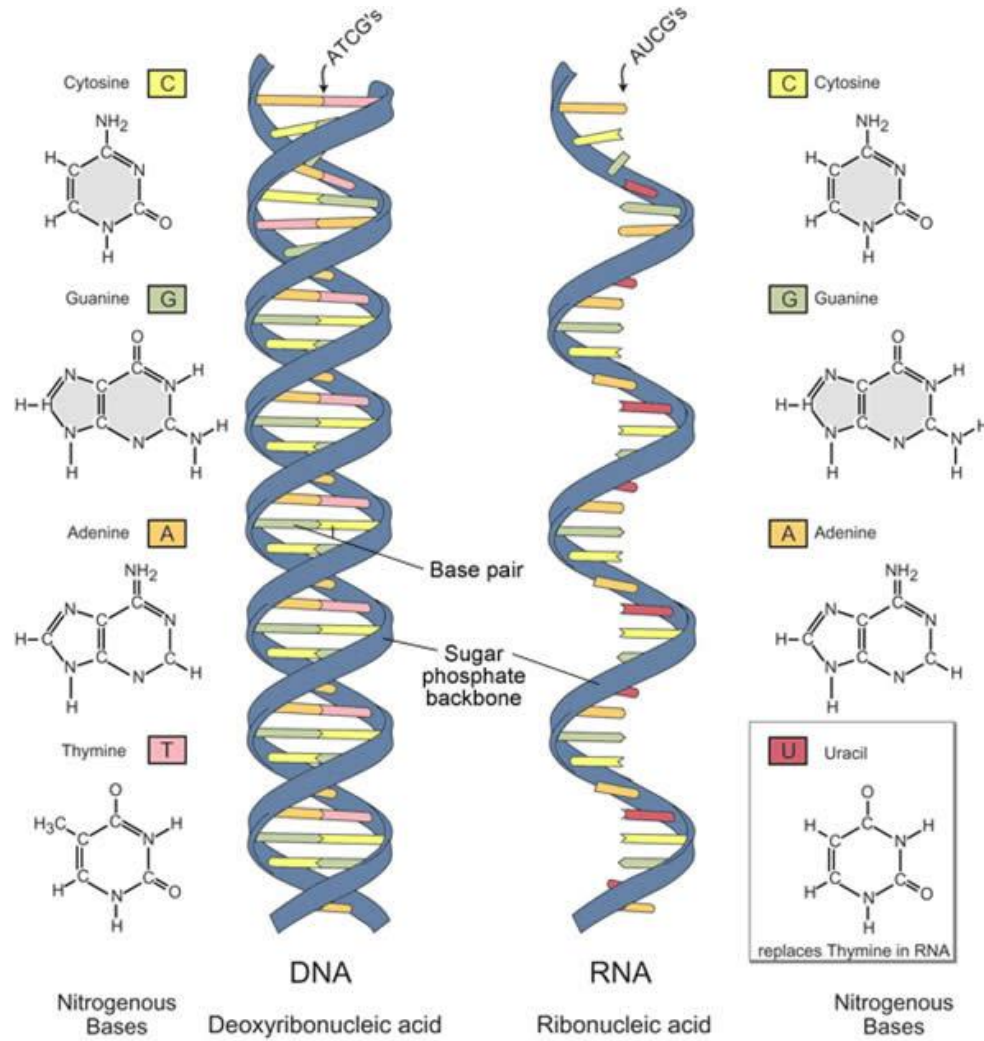
- ✓ Agropecuária vai passar por muito mais mudanças tudo por conta da Biotecnologia.



✓ Engenharia Genética

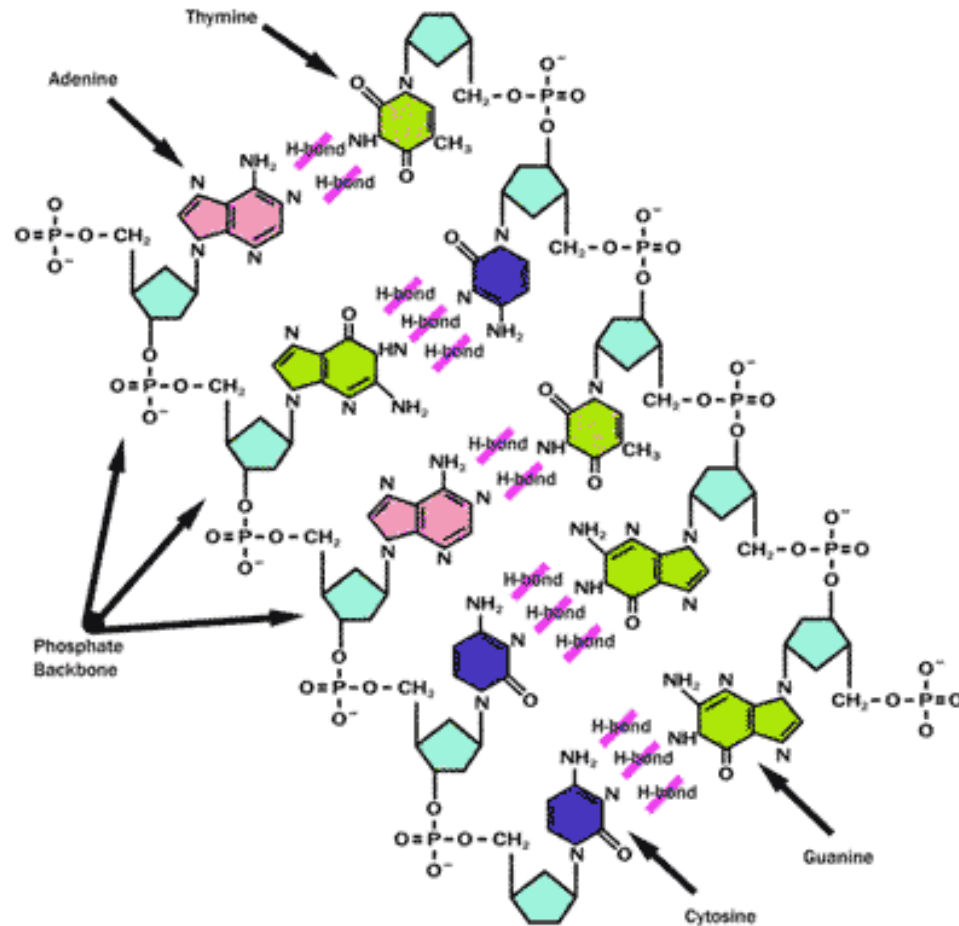


✓ DNA e RNA

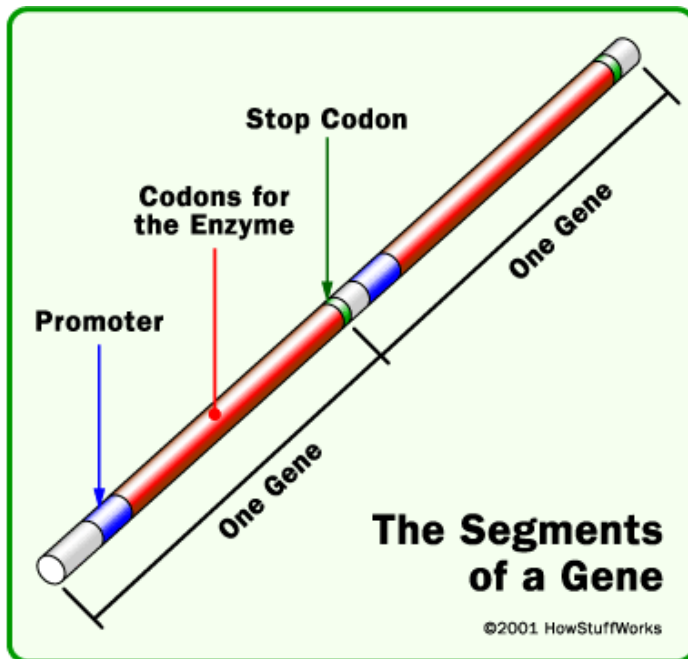
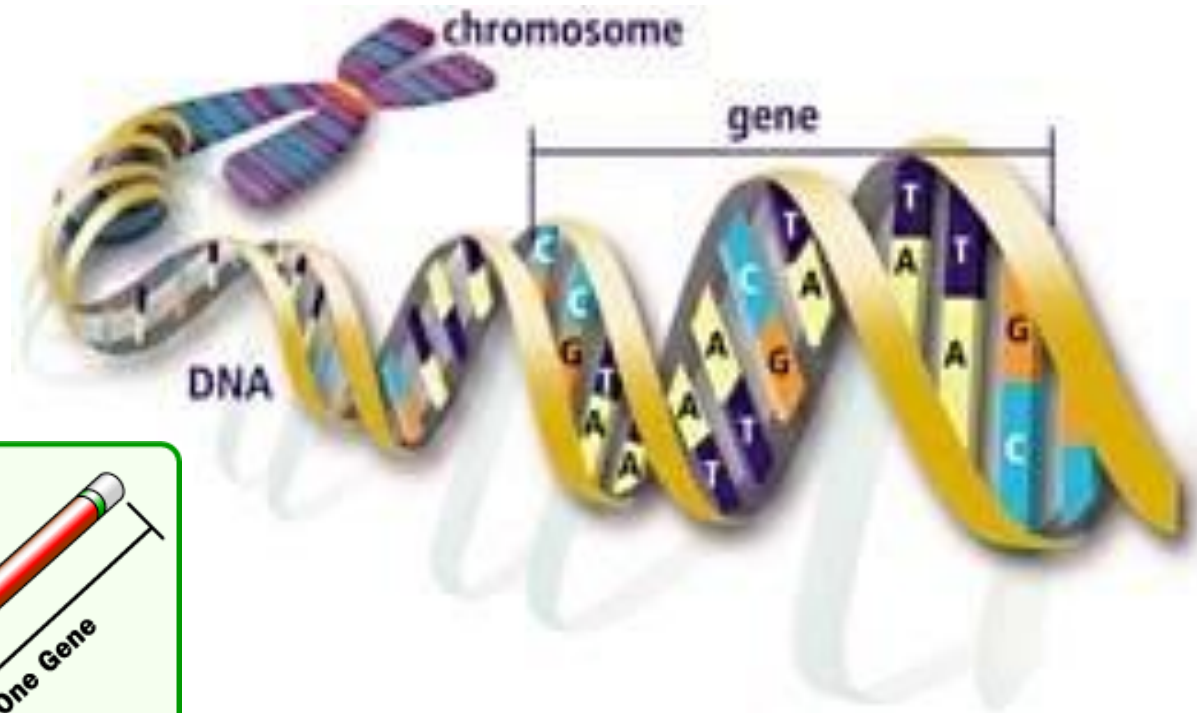


✓ DNA

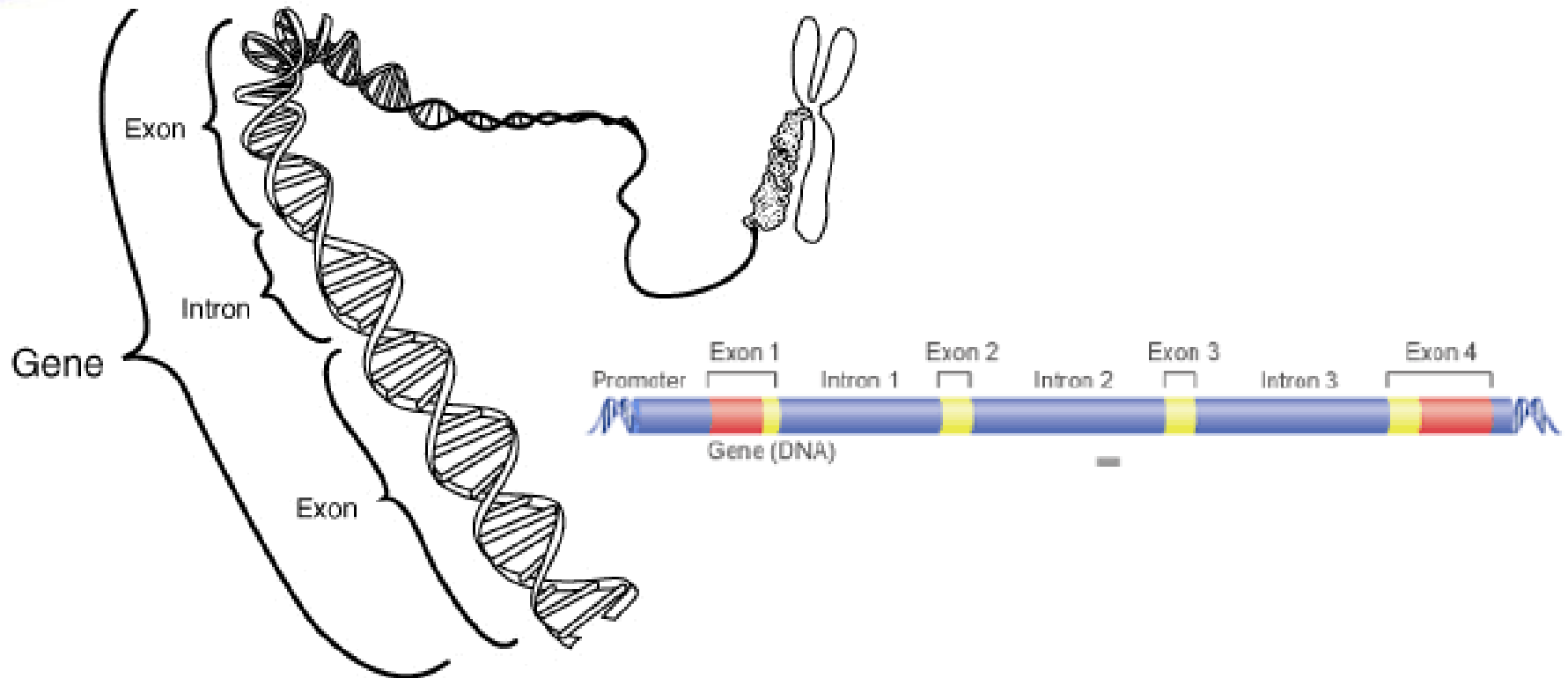
✓ 5' ----- 3'



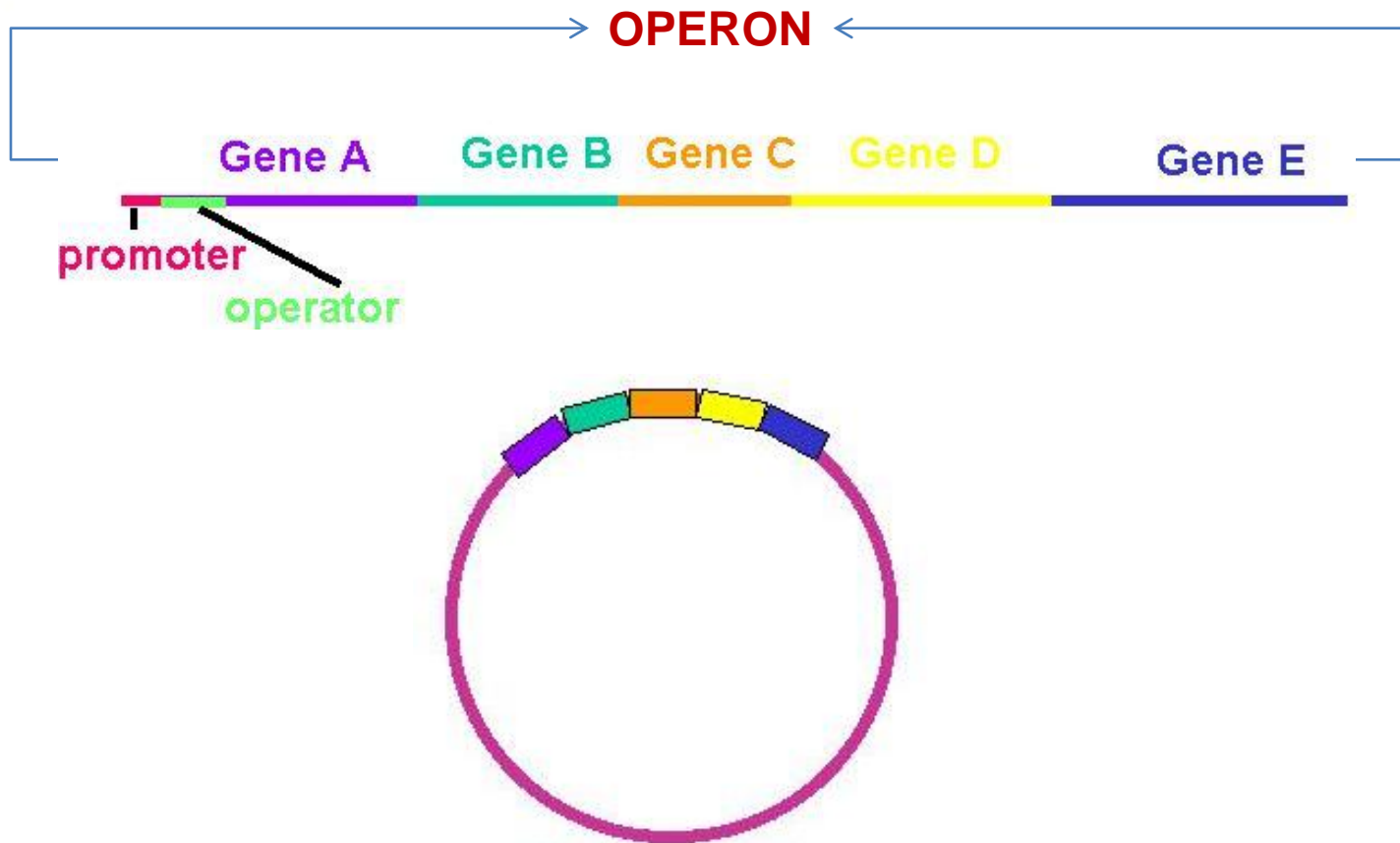
✓ Gene



✓ Gene

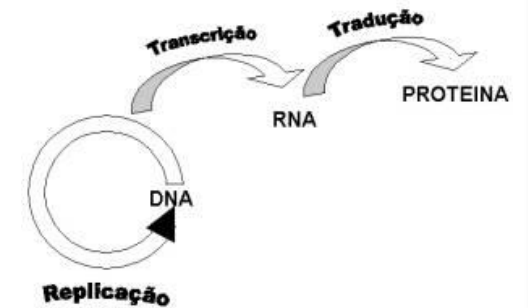
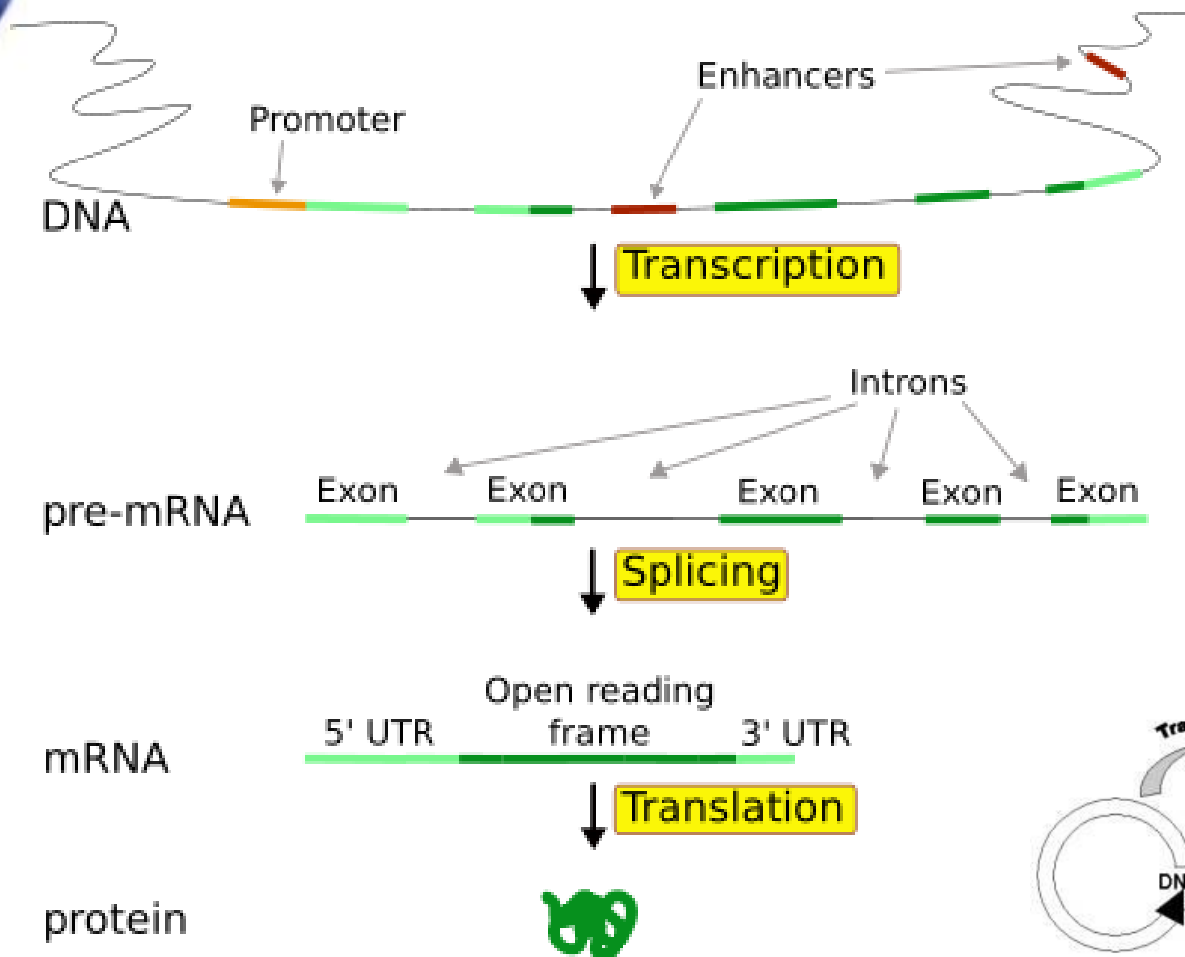


✓ Gene

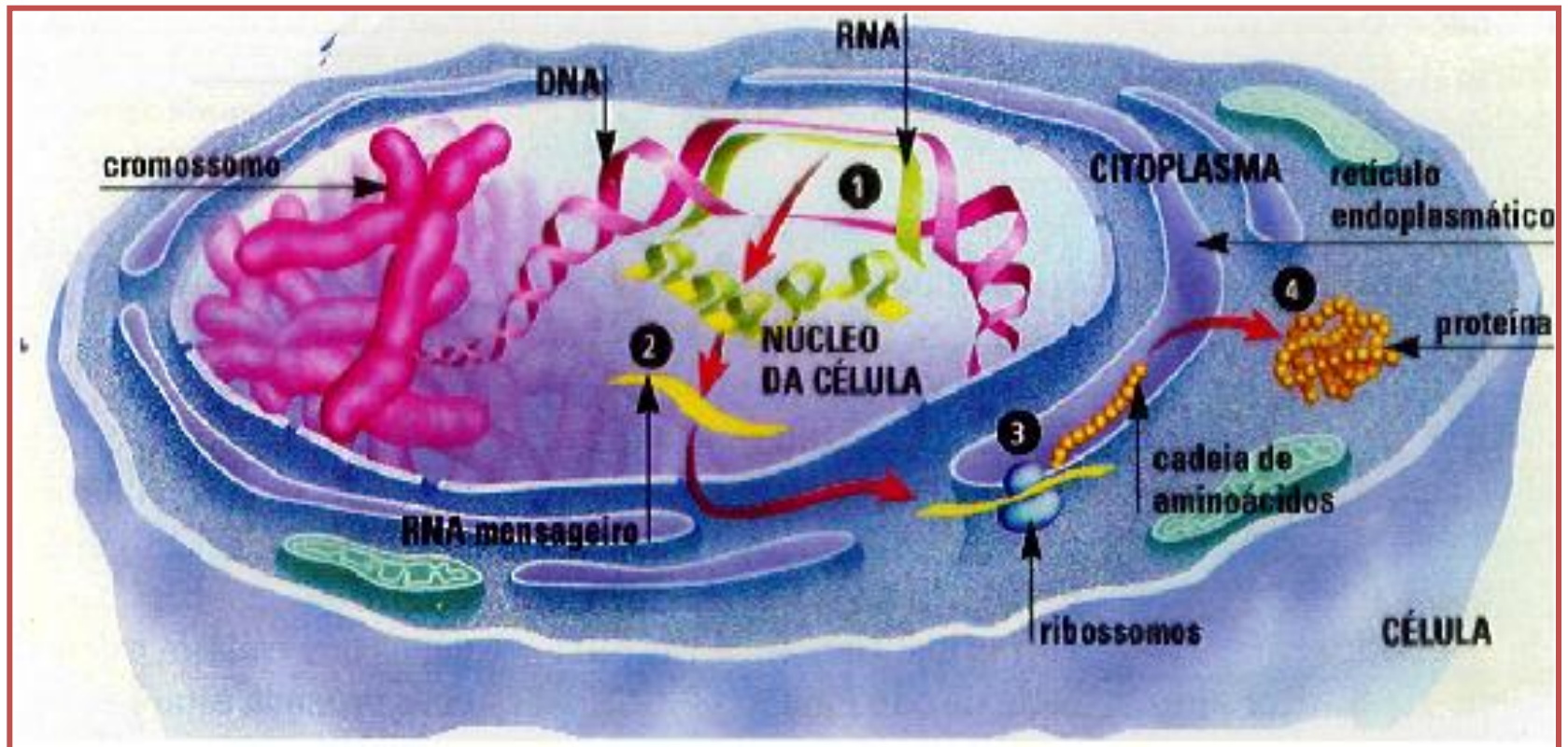




✓ Síntese Protéica

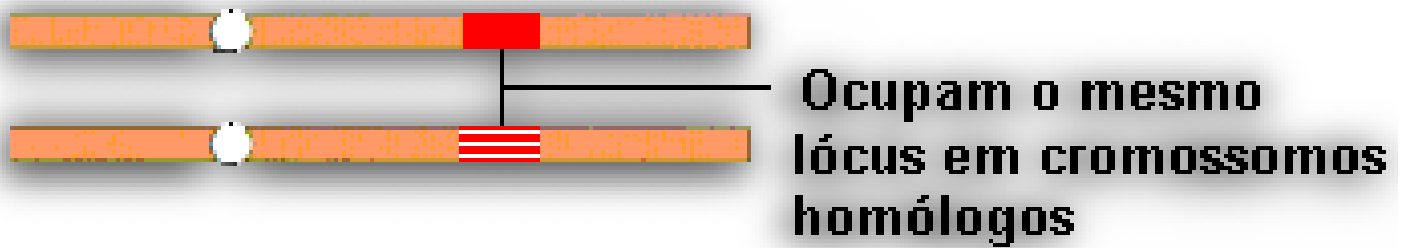


✓ Síntese Proteica



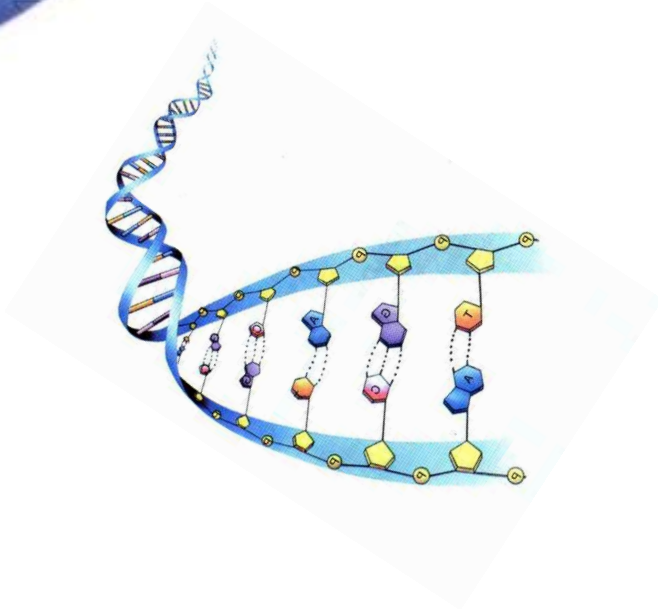
✓ Alelo

## 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

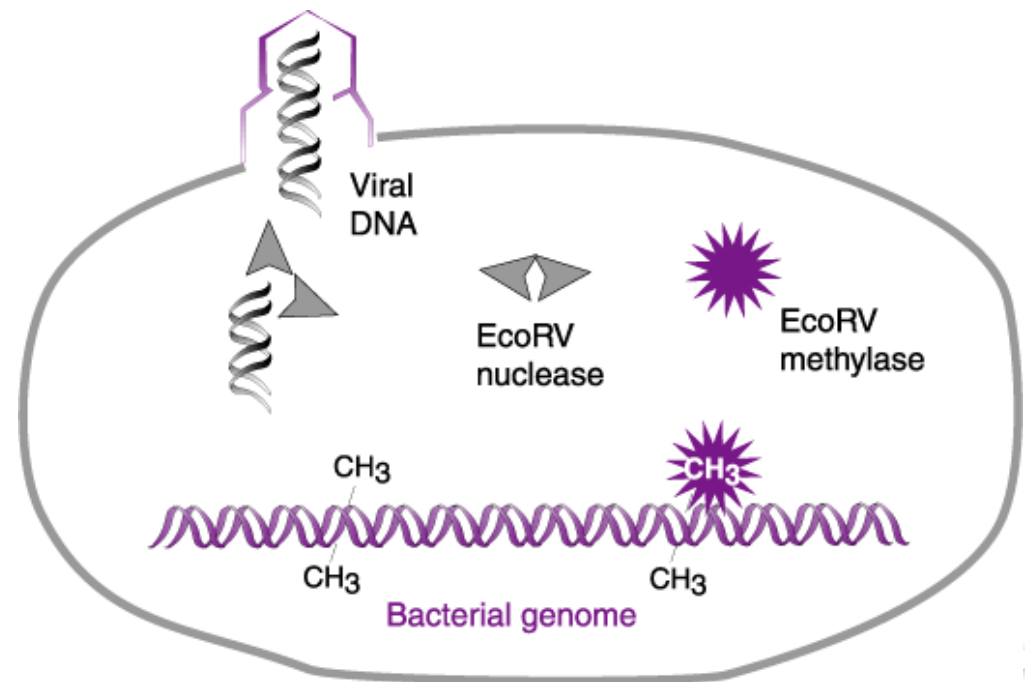
---

✓ Enzima de Restrição

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

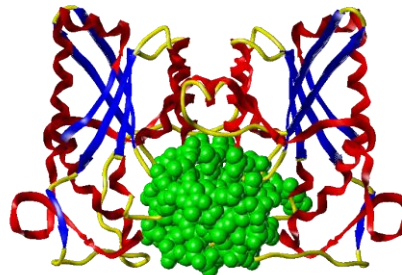
✓ *Função natural: proteger o DNA bacteriano do DNA exógeno*

✓ 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'

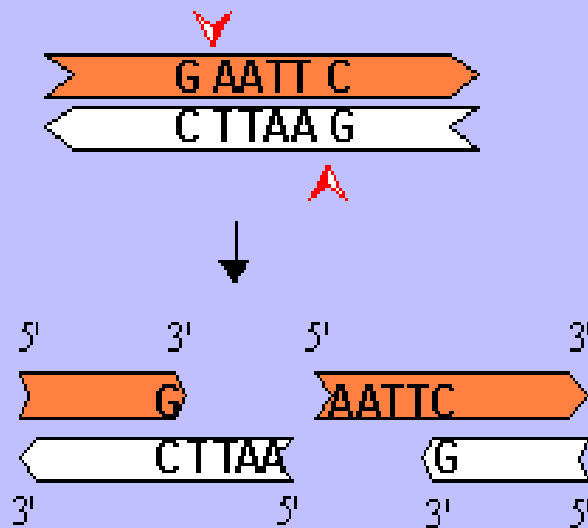
✓ *Hae*III - *Haemophilus aegyptius*  
5' GG/CC 3'

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

---

✓ Enzima de Restrição

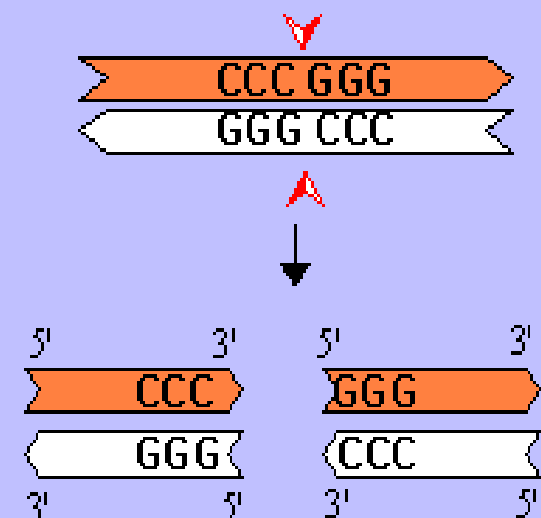
A. Corte assimétrico



Fragmentos com terminais coesivos

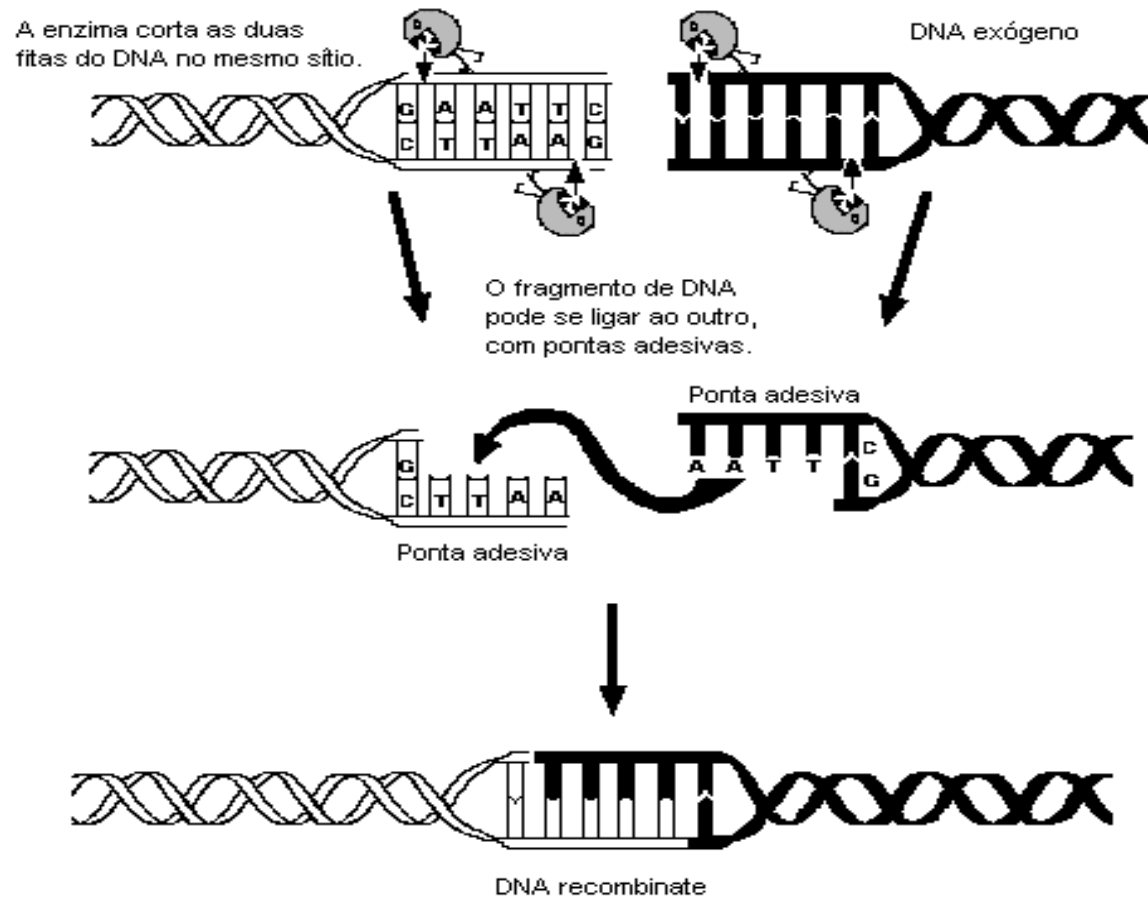
Separação dos  
fragmentos

B. Corte simétrico



Fragmentos com terminais abruptos

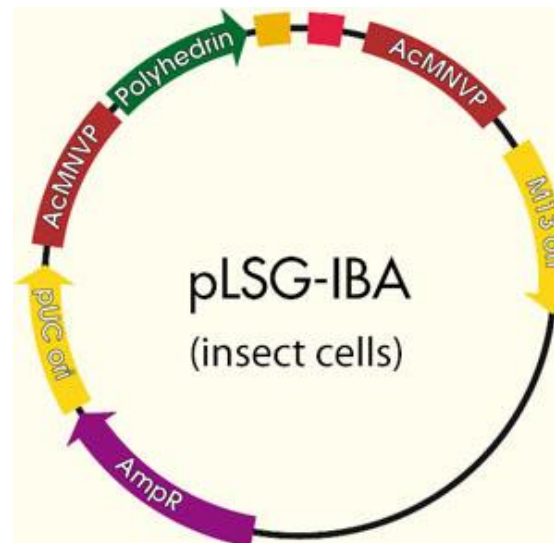
## Enzima de Restrição Ação da EcoR1



✓ 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

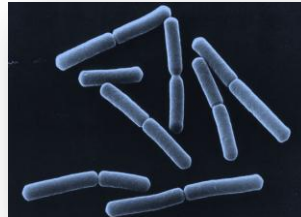


### Bacteriófagos



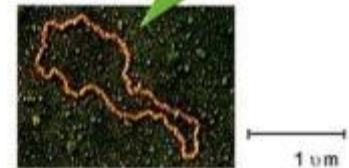
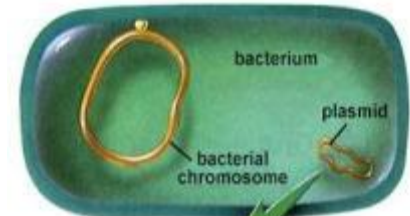
## Hospedeiros

### Bactérias/leveduras



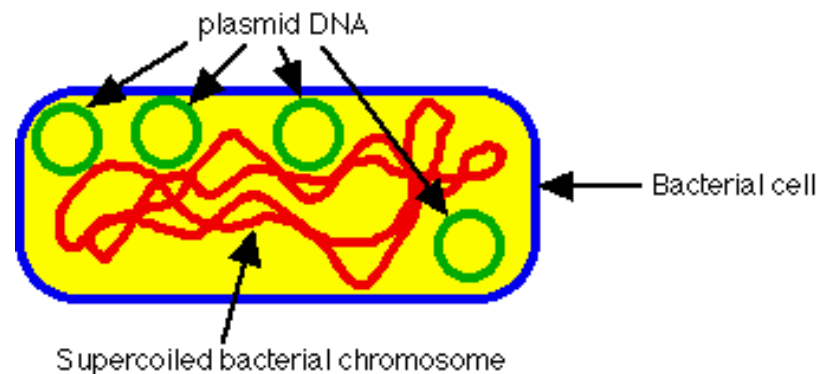
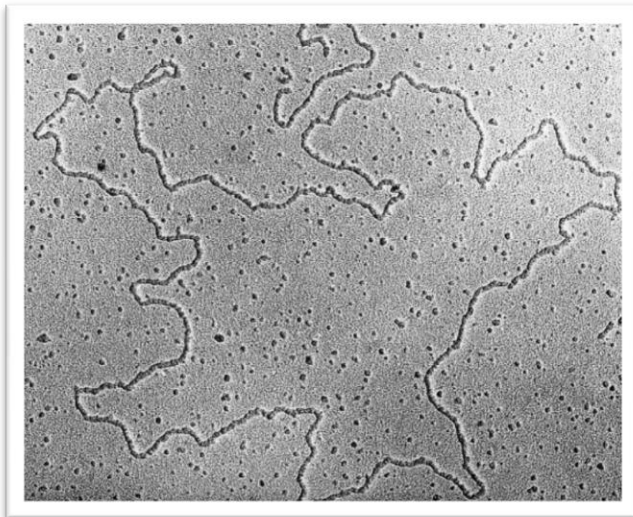
## Utilização

### Clonagem

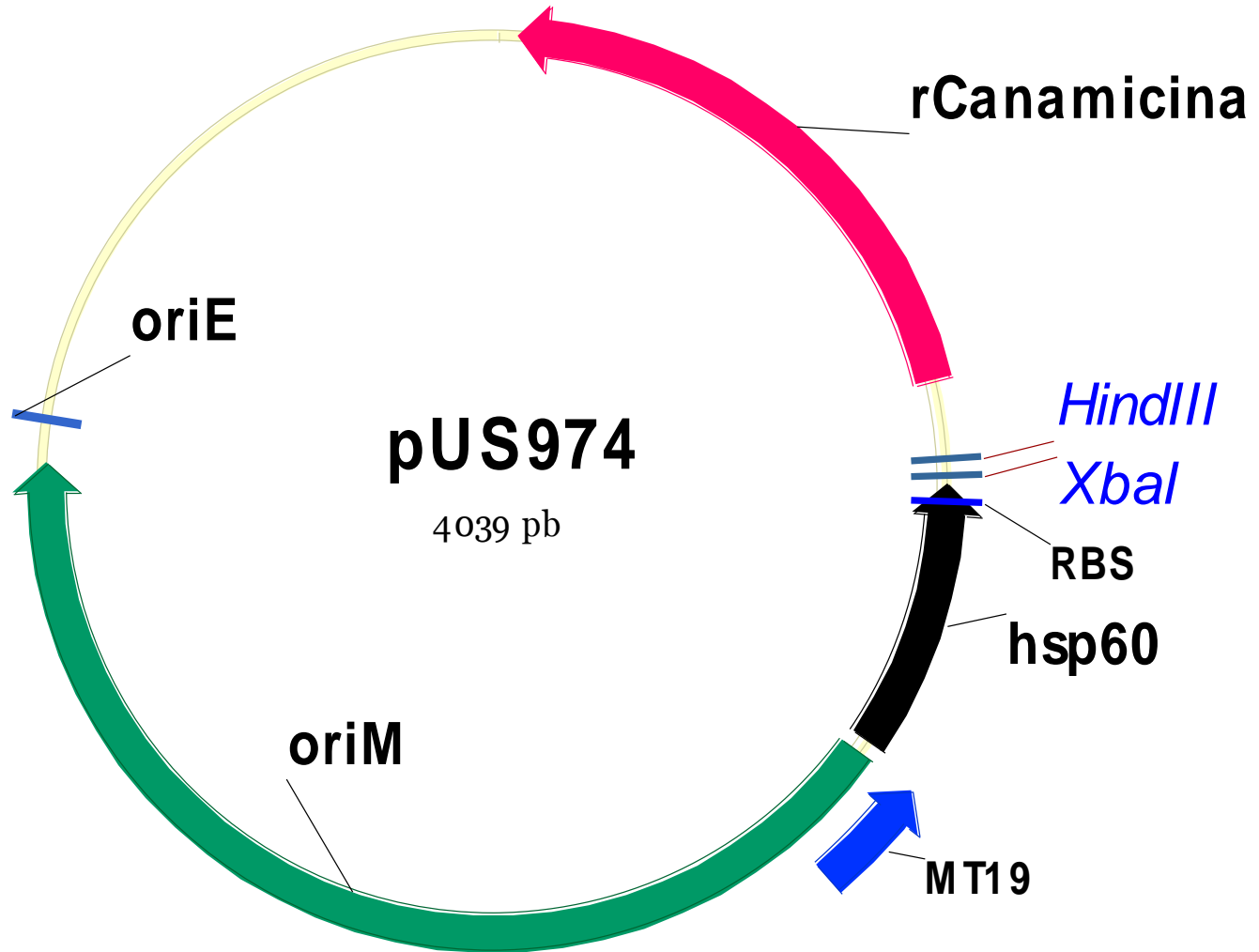


✓ Vetores - Plasmídeos

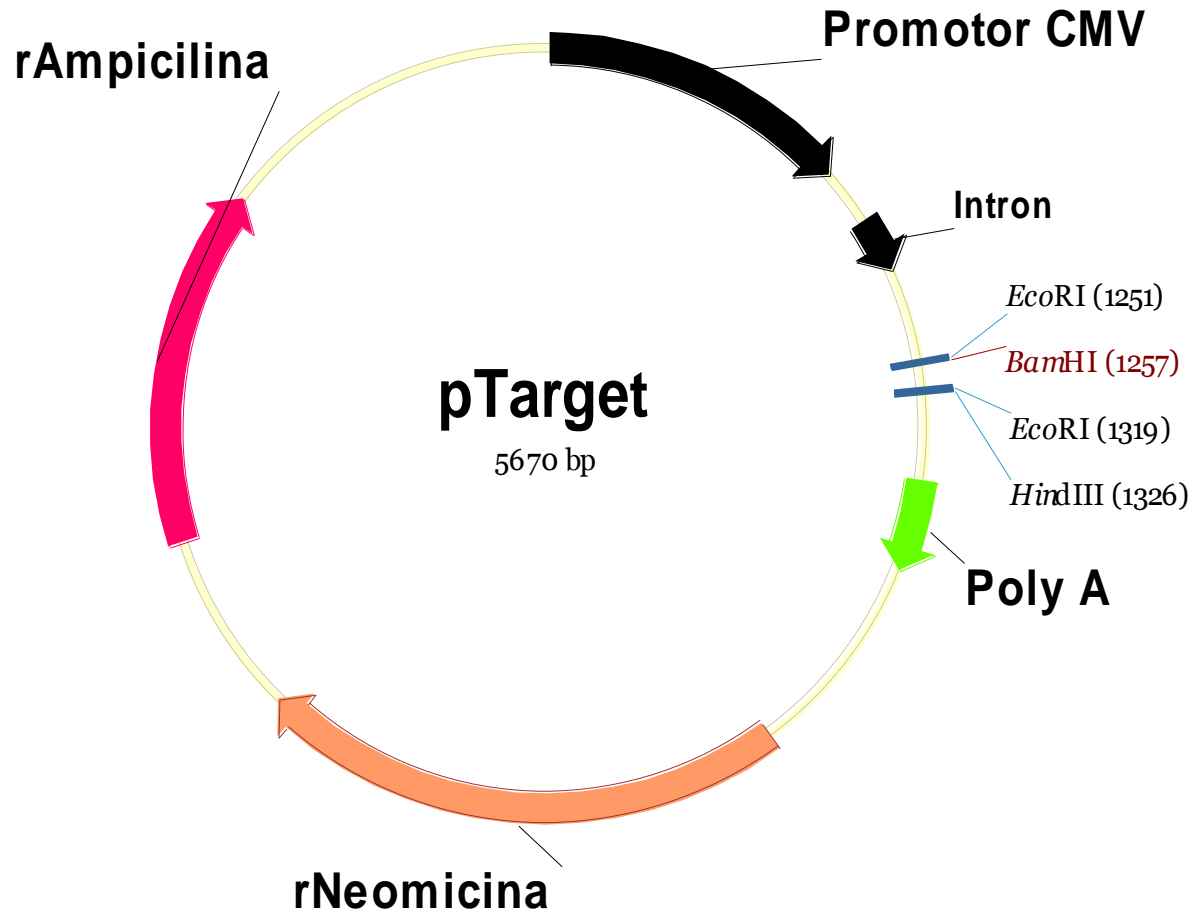
- ✓ Segmentos de material genético extracromossômico capazes de replicação autônoma na célula;
- ✓ Presentes em bactérias, vírus, leveduras, protozoários e plantas;
- ✓ Habilidade de se transferir fisicamente de uma célula para outra.



✓ Vetores - Plasmídeos

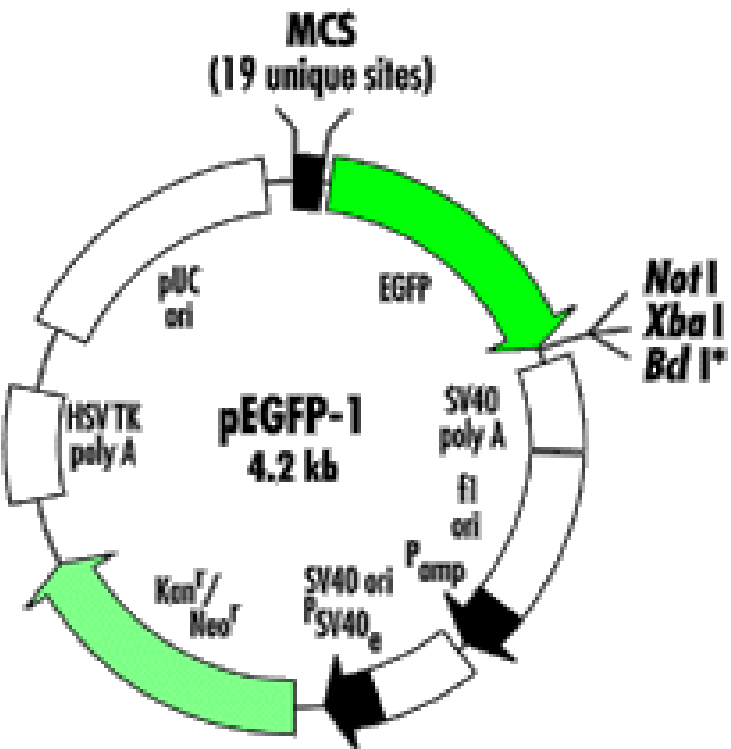


✓ Vetores - Plasmídeos





✓ Vetores - Plasmídeos

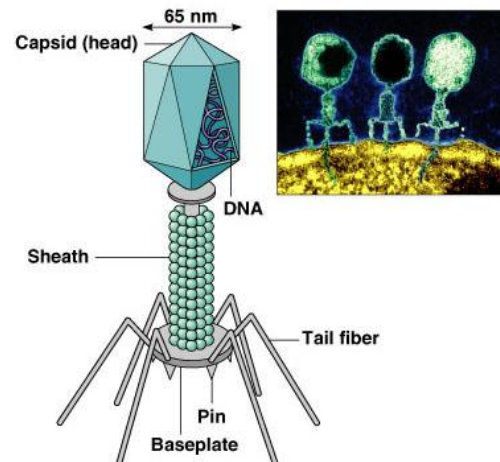


✓ Vetores - Bacteriófagos

✓ 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.



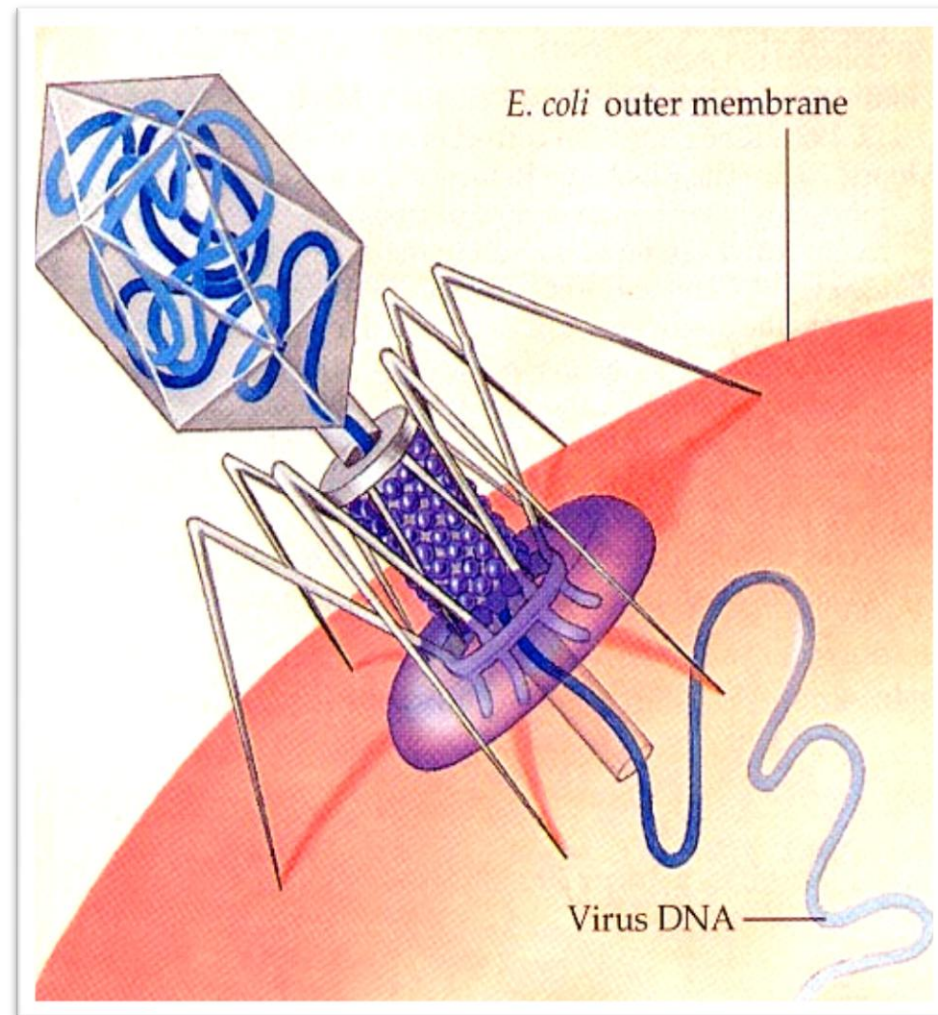
(a) A T-even bacteriophage

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

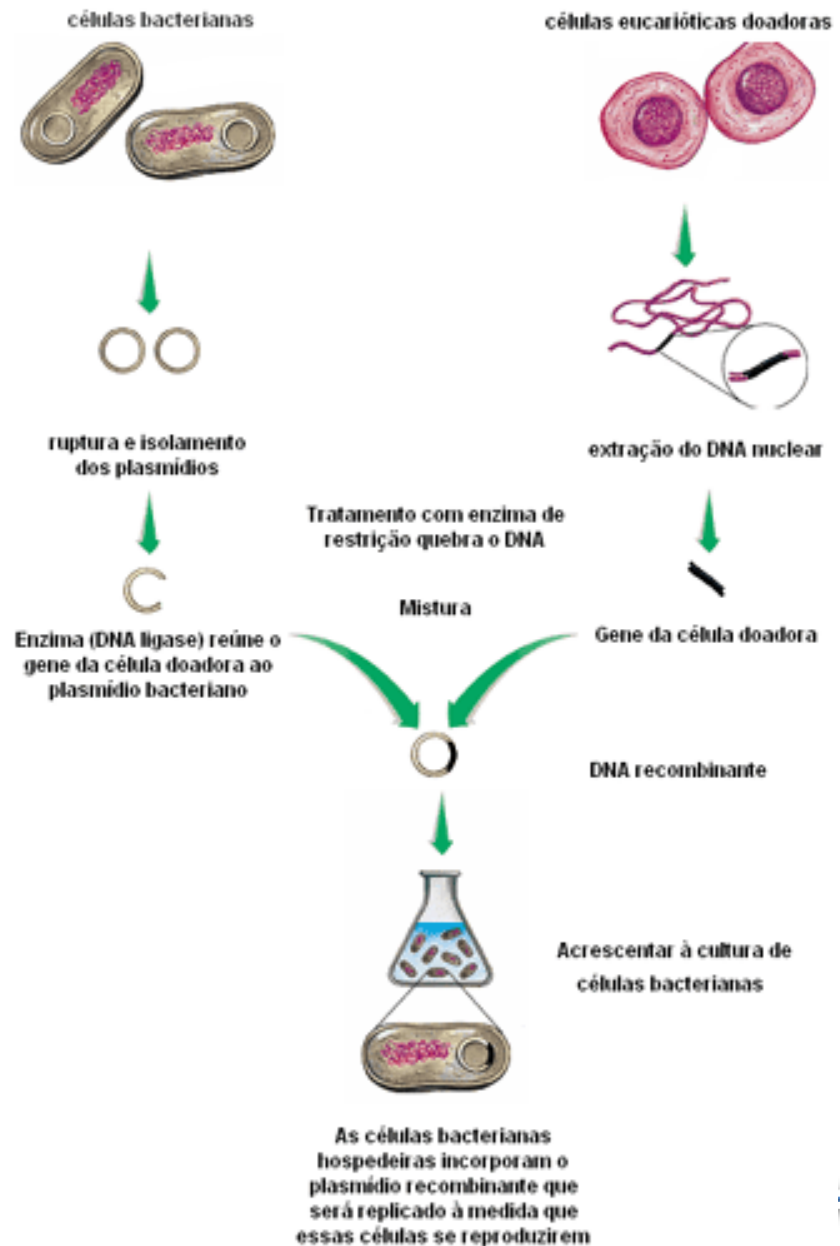
✓ Vetores – Bacteriófagos

✓ Virulento

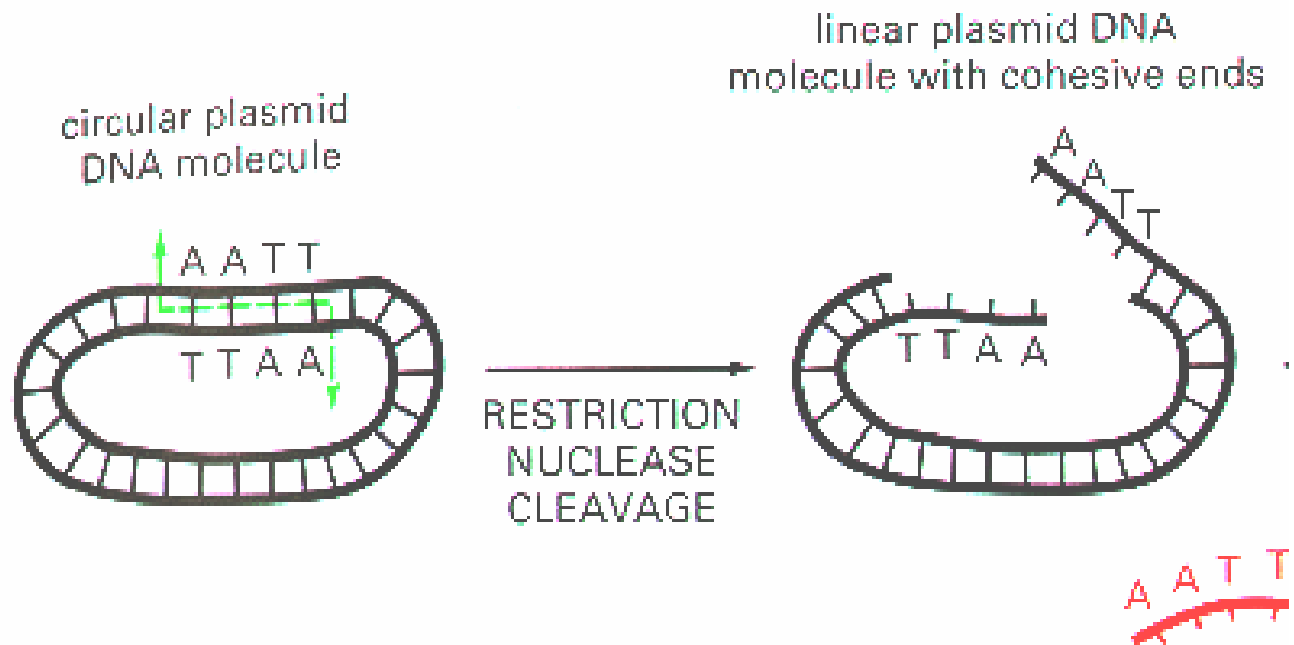
✓ Temperado



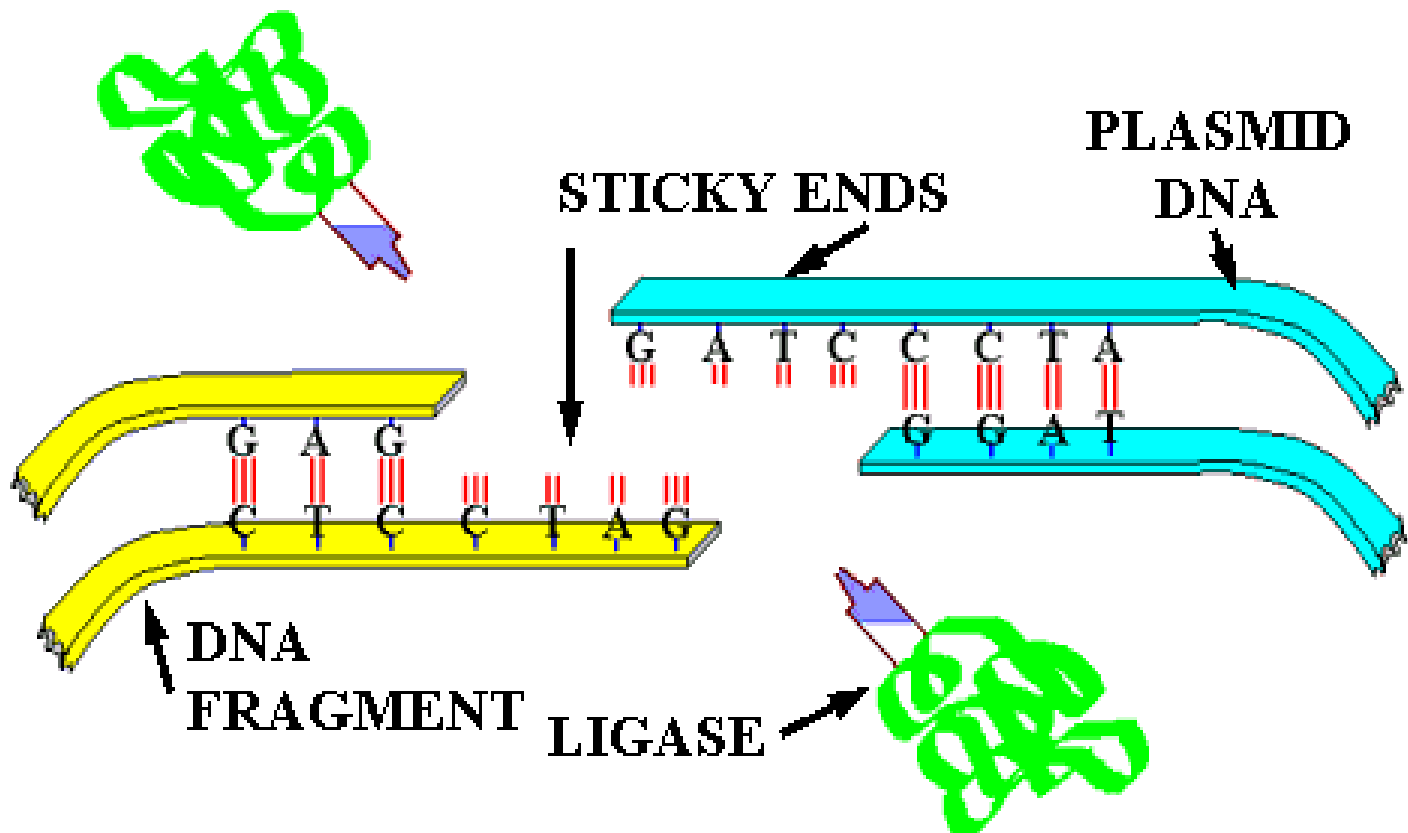
✓ **Construção DNA Recombinante**



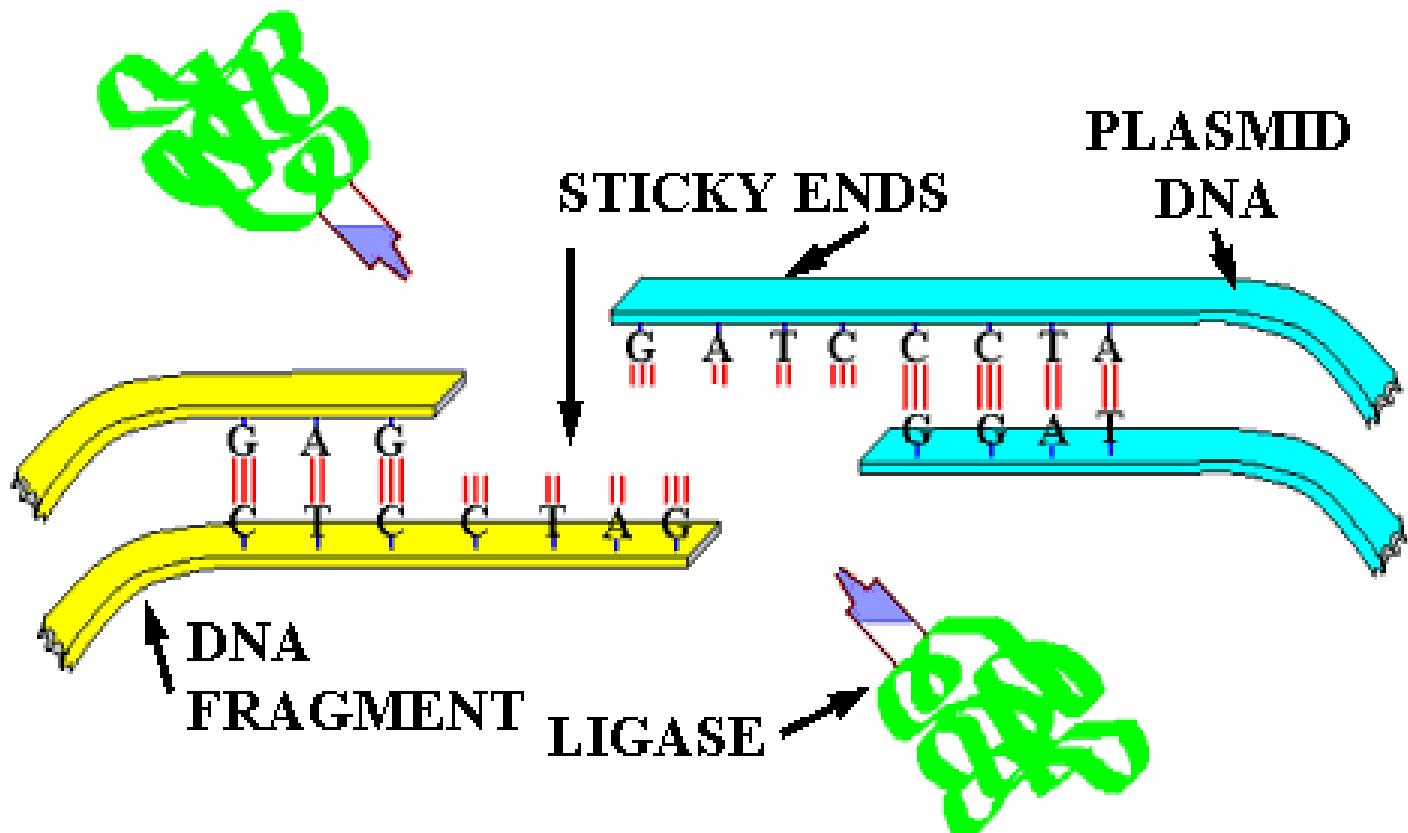
✓ Preparação do plasmídeo



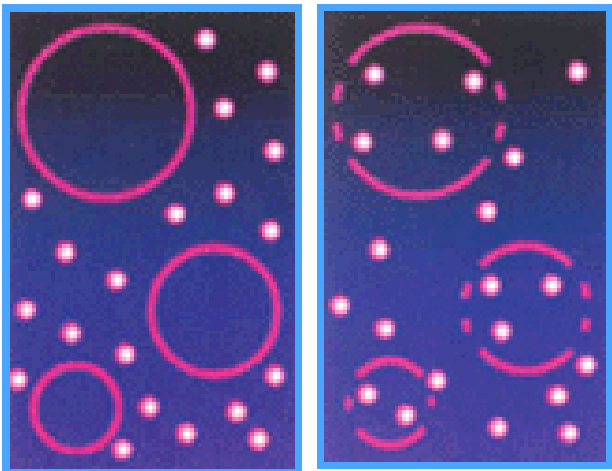
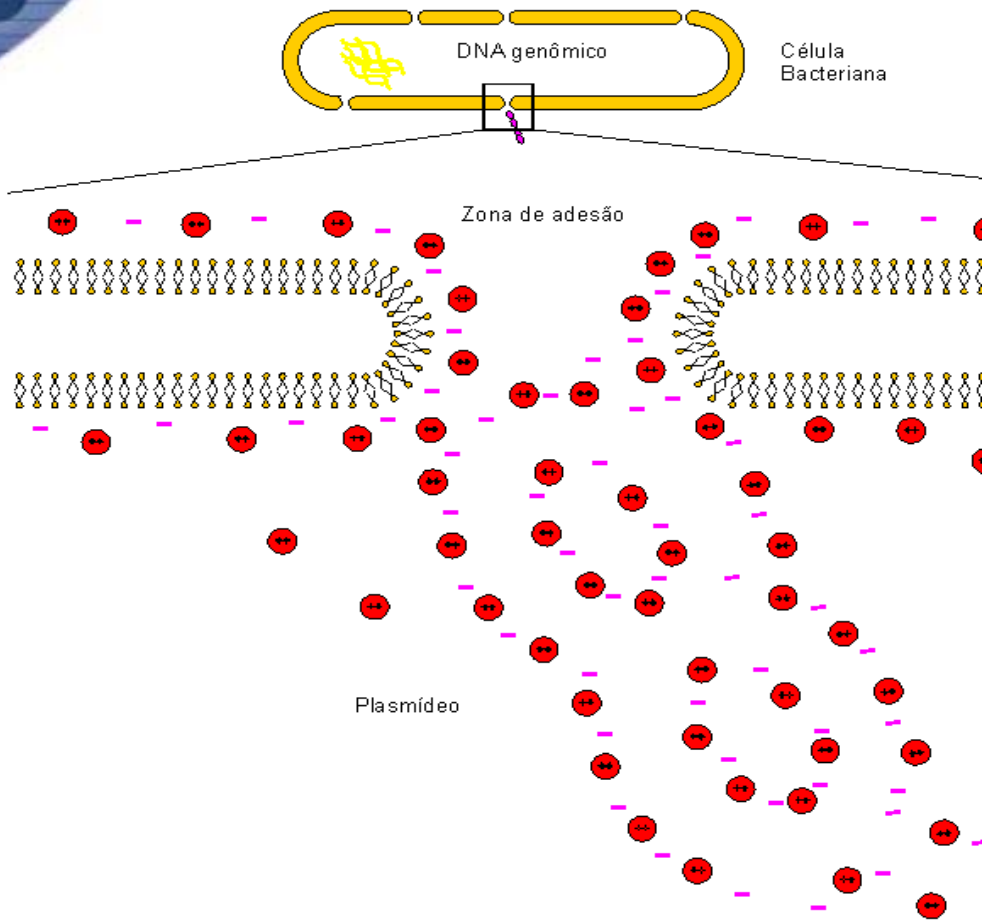
✓ Ligação do inserto ao plasmídeo



✓ Ligação do inserto ao plasmídeo

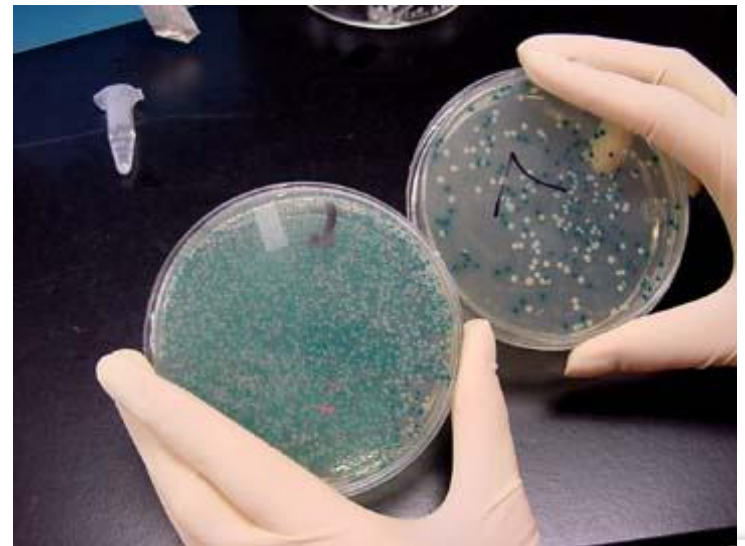


✓ Eletroporação





✓ 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

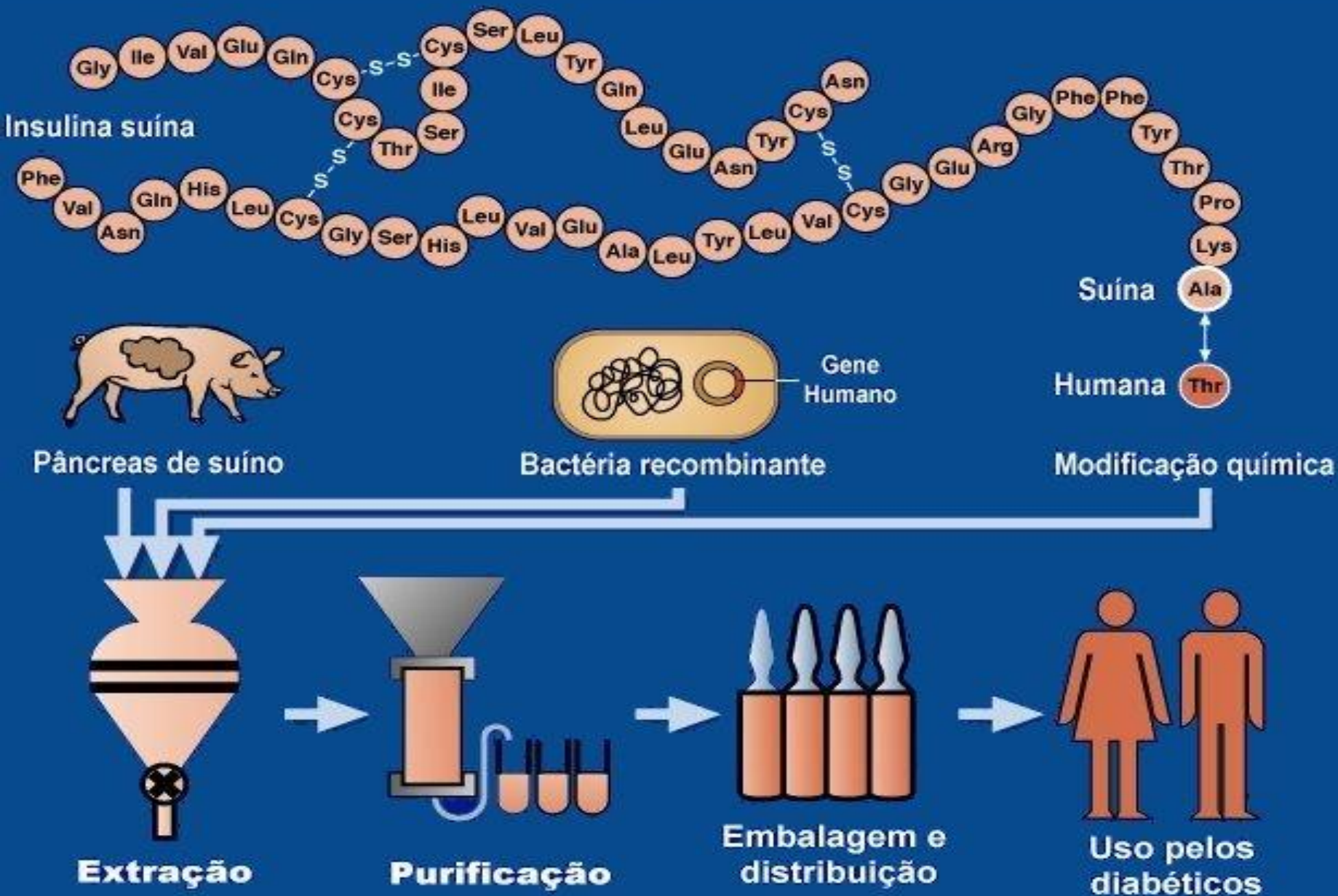


✓ **Clonagem Molecular**

✓ **Vacinas recombinantes**

- Vacina cinomose - recombitek<sup>®</sup> (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

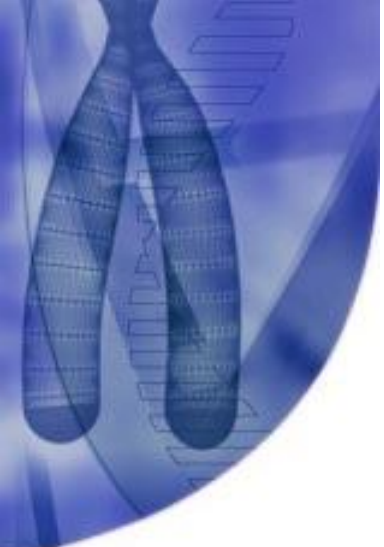
➤ **Objetivo: expressão do gene exógeno no hospedeiro**



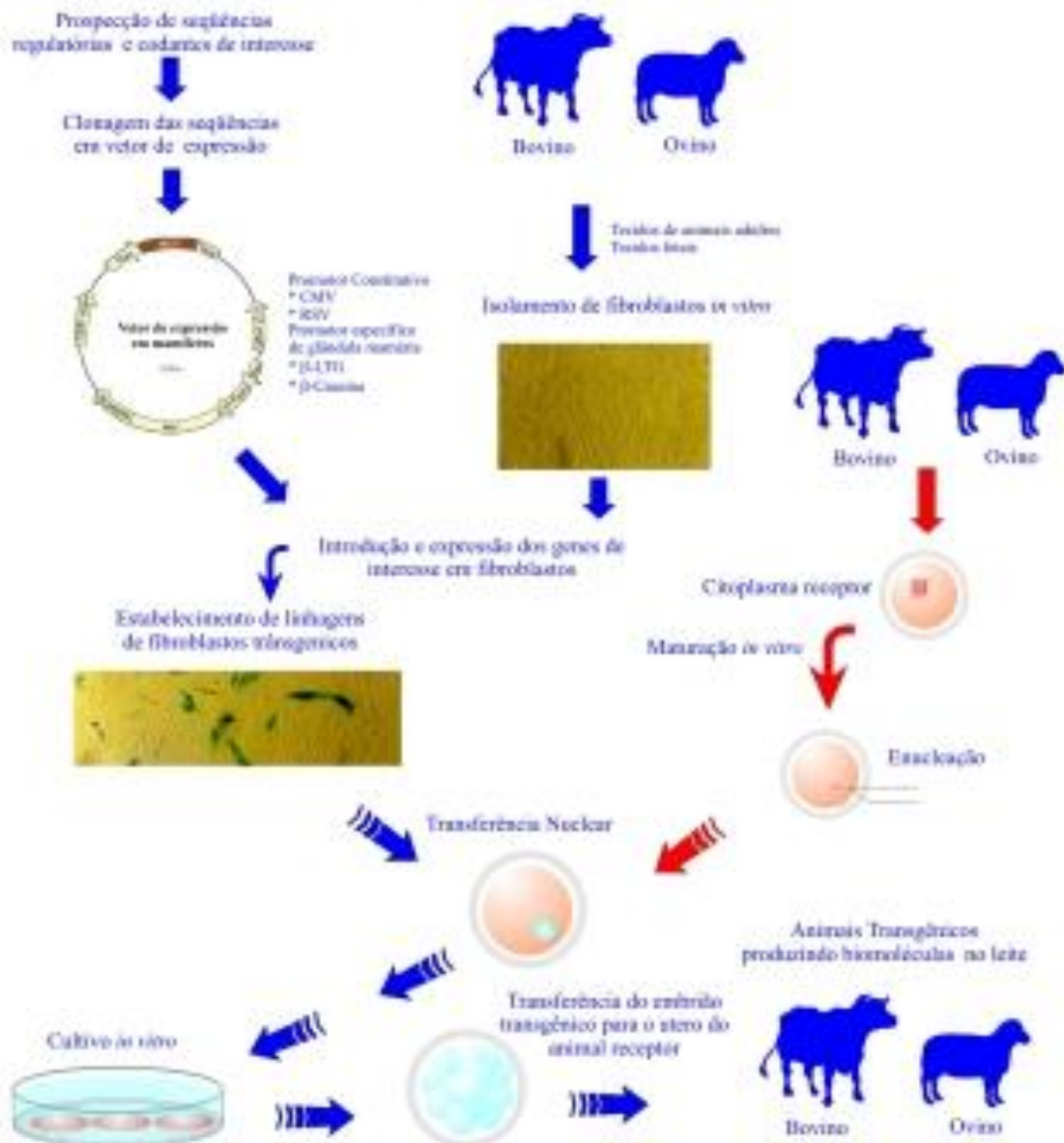
✓ **Clonagem Molecular**

✓ **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*

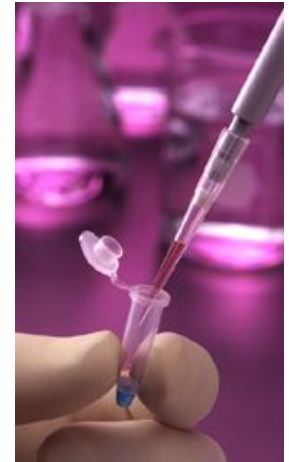
✓ *Objetivos:*

- ✓ *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

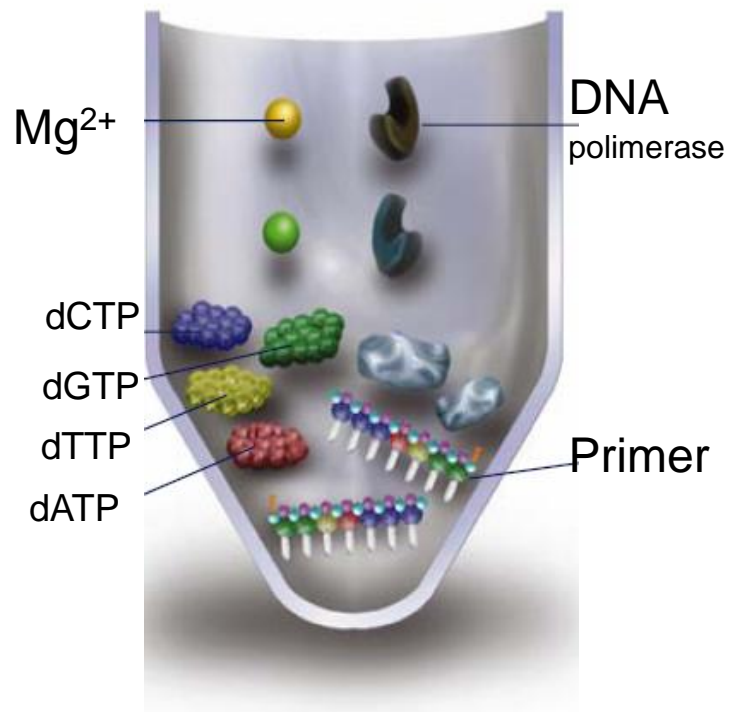
✓ PCR

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

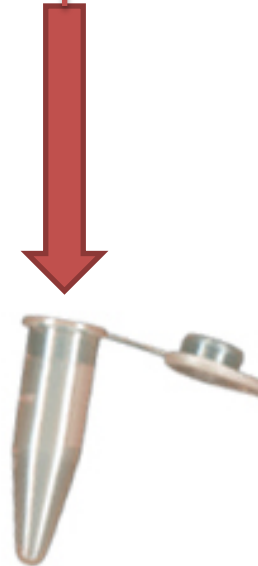
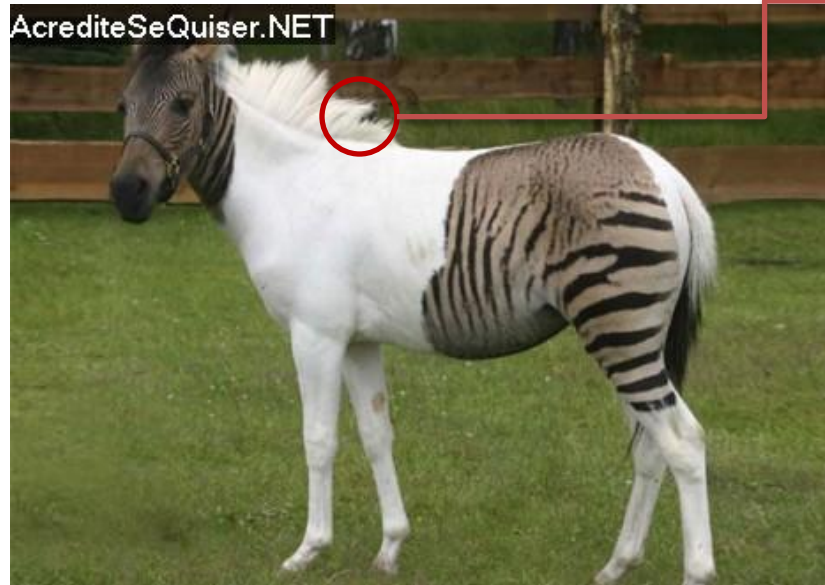


✓ PCR

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



✓ Coleta de Material

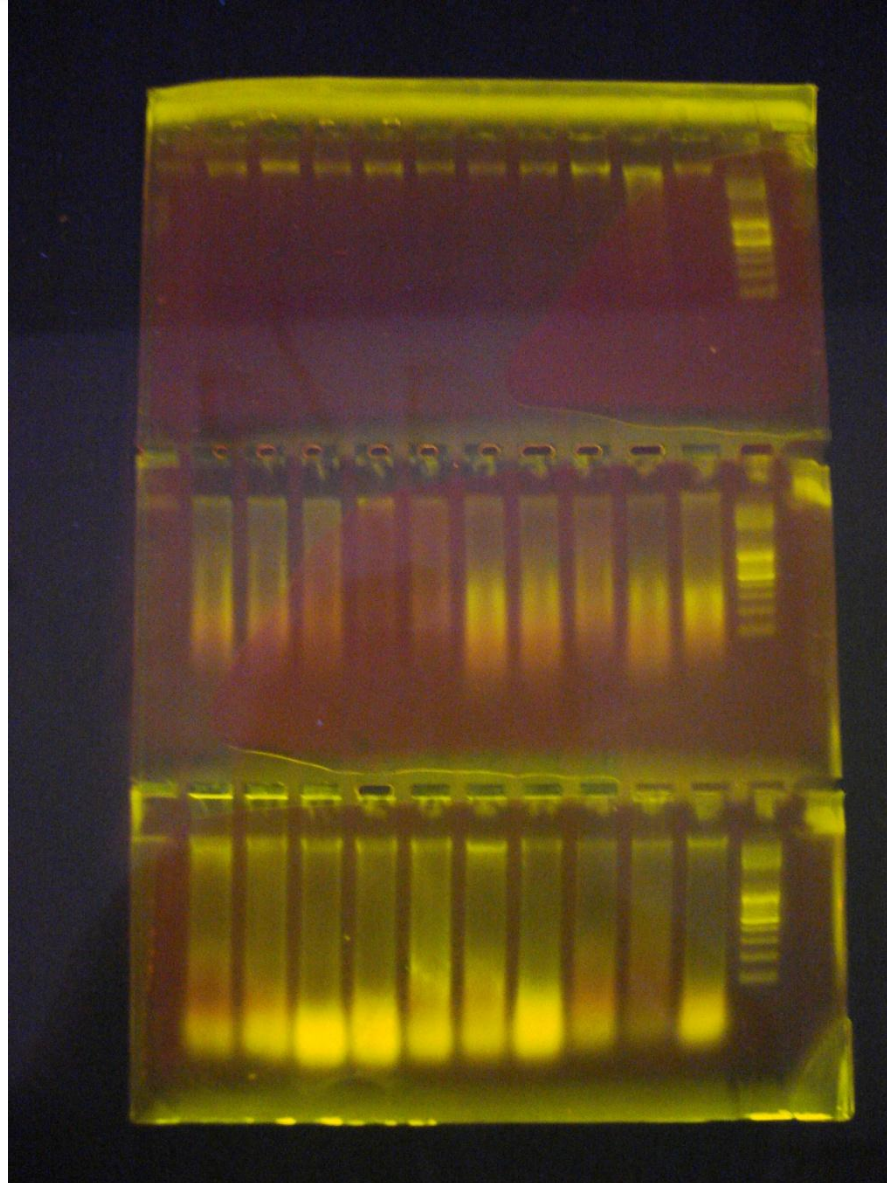


✓ Extração de DNA

- 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'

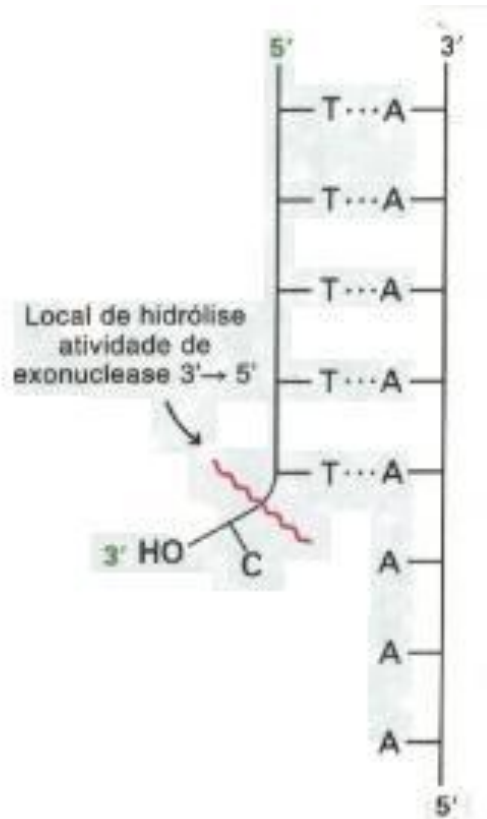
✓ Exonuclese 3' ---> 5

✓ 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%

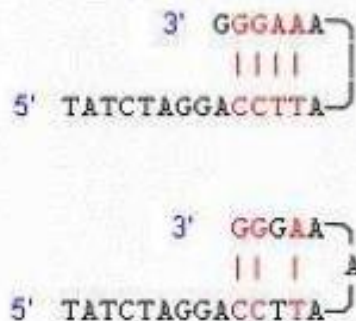
✓ Reduzida regiões de dímeros e hairpins

✓ Temperatura de Anelamento: em torno de 55°C

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

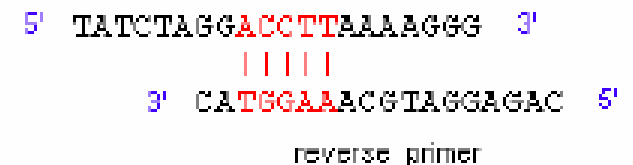
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^{\circ}\text{C}$$

### 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/> Ir Google ncbi Configuraçõ

**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?**

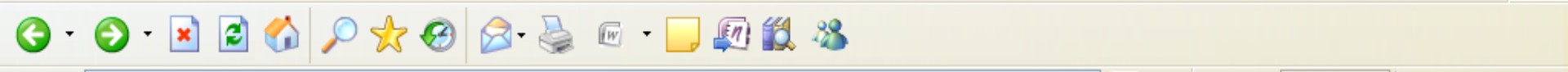
Established in 1988 as a national resource for molecular biology information, NCBI creates public databases, conducts research in computational biology, develops software tools for analyzing genome data, and disseminates biomedical information - all for the better understanding of molecular processes 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:



CGCTCAGGATAGGACTTCGGGCGCTAGAGGATCGGATCCCCGGGCGGTTATTATATAGCTCGATCGATC1  
 TTCTCTATATCCCGGATATGGGATATACACACAGCCCGCGGATAGCATGACTGATCTA  
 CACAGACTACGGTCTCAGTACTTACTAACCAATTCGGGAGAGGGCGCGGGA TCGGCGGAG

**Nucleotide**

My NCBI  
[Sign In](#) [Register](#)

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

Search **Nucleotide** for    [Save Search](#)

Found 1 nucleotide sequence. Nucleotide [1]

Display  Show  Sort by  Send to

**All: 1** Bacteria: 0 RefSeq: 0 mRNA: 1

- 1: [AY323200](#) Reports [Links](#)
- Odontesthes bonariensis prolactin mRNA, partial cds  
 gi|32482458|gb|AY323200.1|[32482458]

[Write to the Help Desk](#)  
[NCBI | NLM | NIH](#)  
 Department of Health & Human Services  
[Privacy Statement](#) [Freedom of Information Act](#) [Disclaimer](#)



My NCBI  
[Sign In](#) [Register](#)

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Nucleotide for [ ] Go Clear

Display GenBank Show 5 Send to Hide:  sequence  all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin to end  Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: [AY323200](#). Reports *Odontesthes bonariensis* [gi:32482458] Links

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS AY323200 425 bp mRNA linear VRT 14-JUL-2003

DEFINITION *Odontesthes bonariensis* prolactin mRNA, partial cds.

ACCESSION AY323200

VERSION AY323200.1 GI:32482458

KEYWORDS .

SOURCE *Odontesthes bonariensis* (pejerrey)

ORGANISM [Odontesthes bonariensis](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Atherinomorpha;  
Atheriniformes; Atherinoidei; Atherinopsidae; Atherinopsinae;  
*Odontesthes*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 425)

AUTHORS Blasco, M., Miranda, L.A. and Somoza, G.M.

TITLE Characterization of the growth hormone family members in *Odontesthes bonariensis*

JOURNAL Unpublished

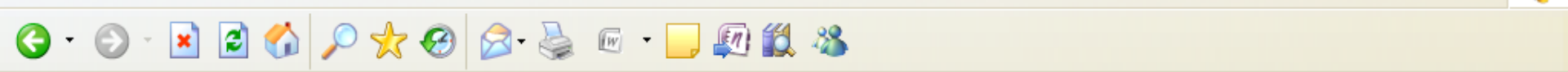
REFERENCE 2 (bases 1 to 425)

AUTHORS Blasco, M., Miranda, L.A. and Somoza, G.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-JUN-2003) *Ictiofisiologia y Acuicultura*, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chacabuco





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 tgtegetggc tgcctccctg ctccaagcct ggggtggacc
181 cctgggtggc ctgtcccact ctgctagcac tctgcctcac ccagcccaaa gcactataaa
241 caacaagatc caggagctgc aacagcactc aaaaagcctg ggagatggcc tggatatact
301 atccaacaag atgggtccgg ctgctcaggc catctcctca ctgccatata gaggagccac
361 tgatccgggc caggacaaga tatctaaact tgtccacttt aactttctgc tgtcctgct
421 tcgcc

```

//

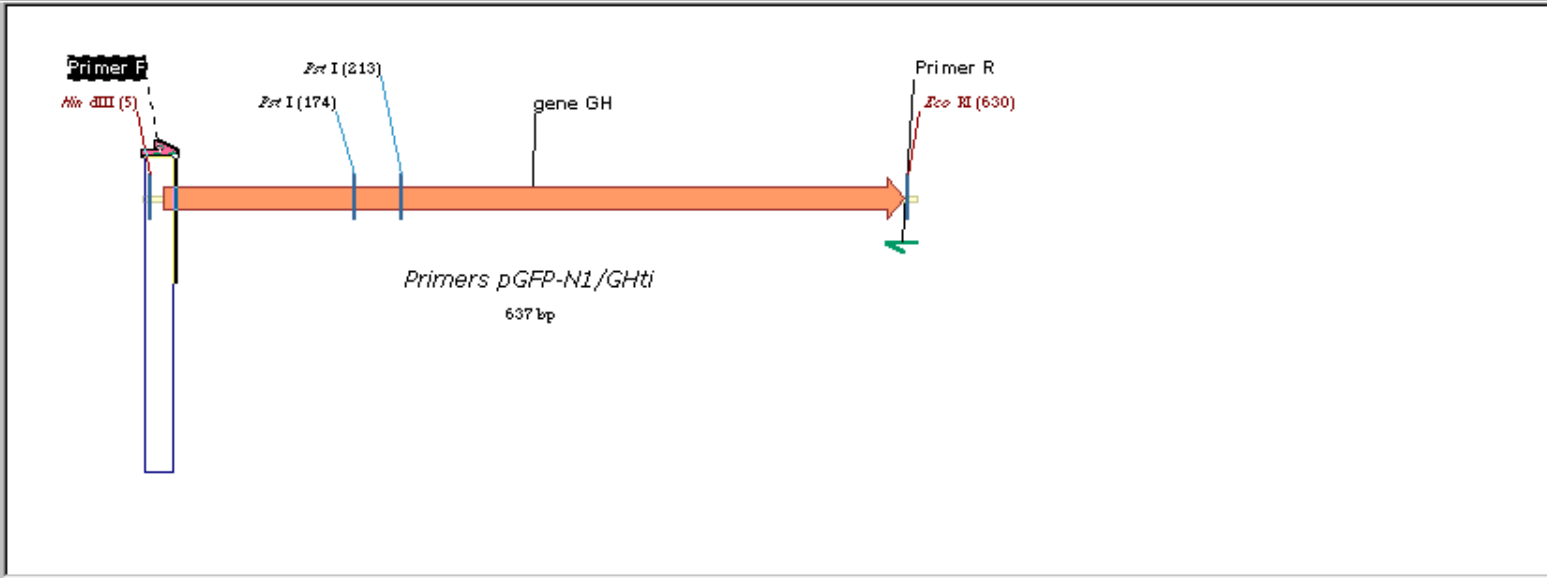
[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Molecule Edit View Analyses Gel List Align Assemble Tools Window Help

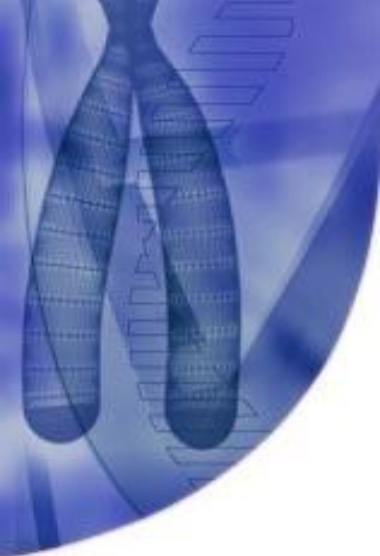
Active Pane: [Icons]

**Primers pGFP-N1/GHti**

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



1	HindIII TAGAAGCTTC CAGCCATGAA CTCAGTCGTC CTCCTGCTGT CGGTTGTGTG TTTGGGGCGTC TCCTCTCAGC AGATCACAGA CAGCCAGCGT TTGTTCTCCA ATCTTCGAAG GTCGGTACTT GAGTCAGCAG GAGGACGACA GCCAACACAC AAACCCGCAG AGGAGAGTCG TCTAGTGTCT GTCGGTCGCA AACAAAGAGGT
101	PstI TTGCAGTCAA CAGAGTCACG CACCTGCACC TGCTCGCCCA GAGACTCTTC TCGGACTTTG AGAGCTCTCT GCAGACGGAG GAGCAACGTC AGCTCAACAA AACGTCAGTT GTCTCAGTGC GTGGACGTGG ACGAGCGGGT CTCTGAGAAG AGCCTGAAAAC TCTCGAGAGA CGTCTGCCTC CTCGTTGCAG TCGAGTTGTT
201	PstI 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
601	EcoRI CTCTCTCCAG AACCAACTC CACTCTCACA ATTCCCT



**BIONEER**

ISO 9000:2001 Certified

Company: Bioneer Ltd.  
 Phone: +82-42-750-8500  
 Fax: +82-42-750-8700  
 E-mail: sales@bioneer.com  
 Web: www.bioneer.com



New Technology Certification from ATS (Korea)

**Bioneer Oligo Synthesis Report**

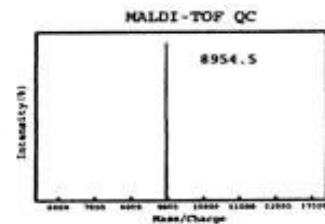
**Dr. Heden Luiz**

**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	



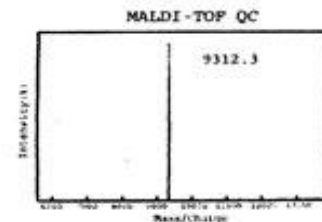
**Dr. Heden L**

**Lot Number : 070528-79**

**PRLPR-ext6**

GTC TTT GTC ATT GGG CGT CTG TAG CGA GGA

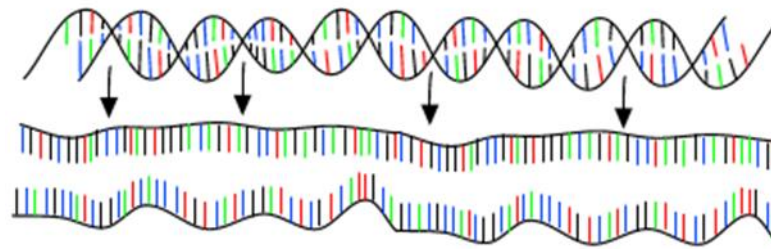
Optical Density	3.0 OD	Purification	Bio-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	None
Scale	0.025 umoles	GC content	53.3 %
Length	30 mer	Molecular Weight	9299.8 g/mole
Tm	70.5 C	Volume for	95.0 ul
		100 pmoles/ul	



✓ PCR

✓ Ciclo da reação

1- Desnaturação



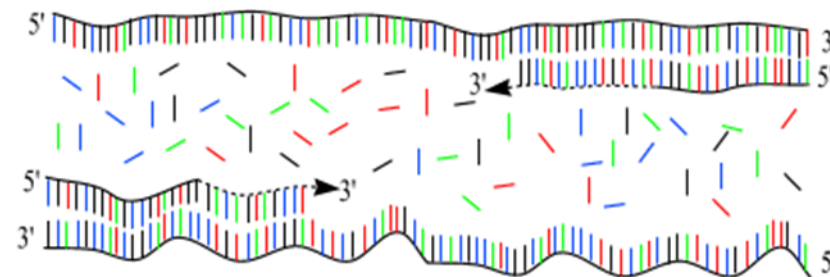
94 - 95°C

2- Anelamento



50 - 65°C

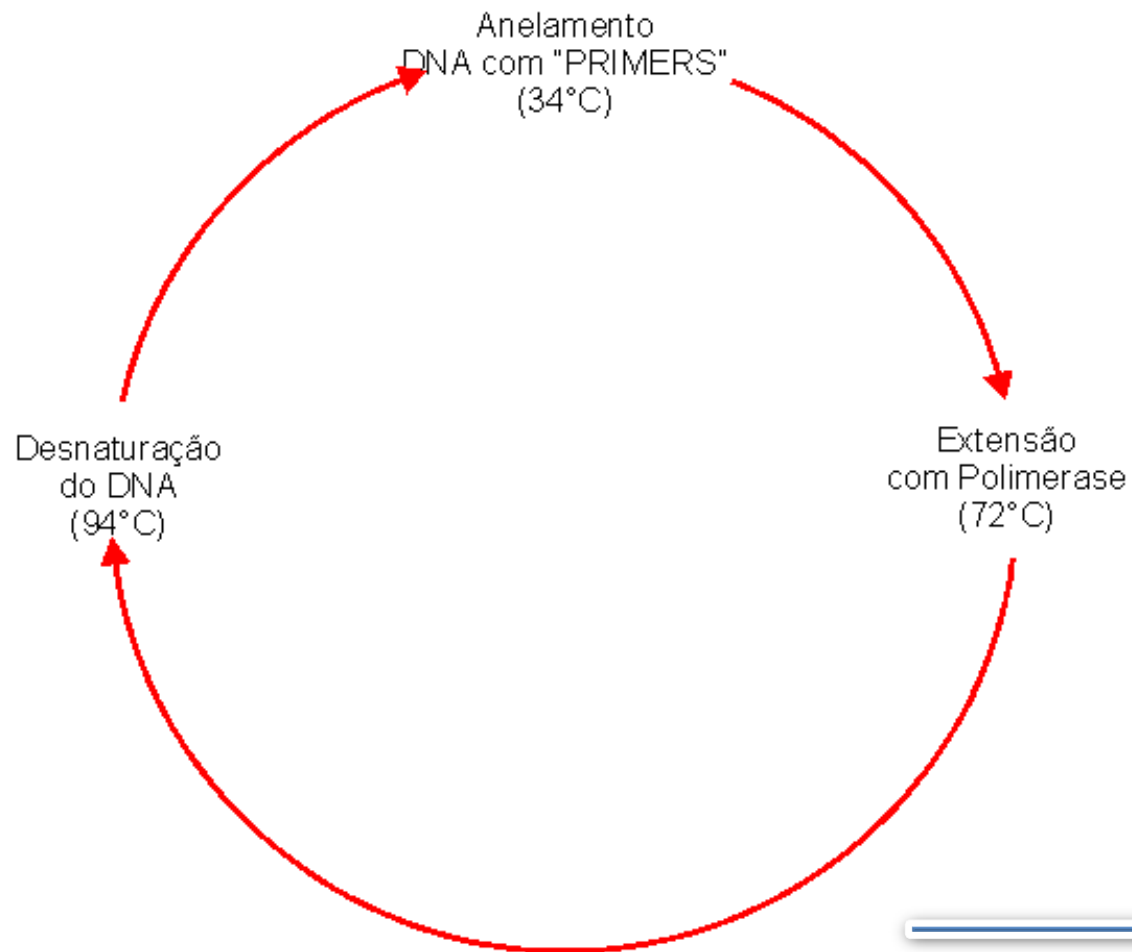
3 - Extensão



72°C

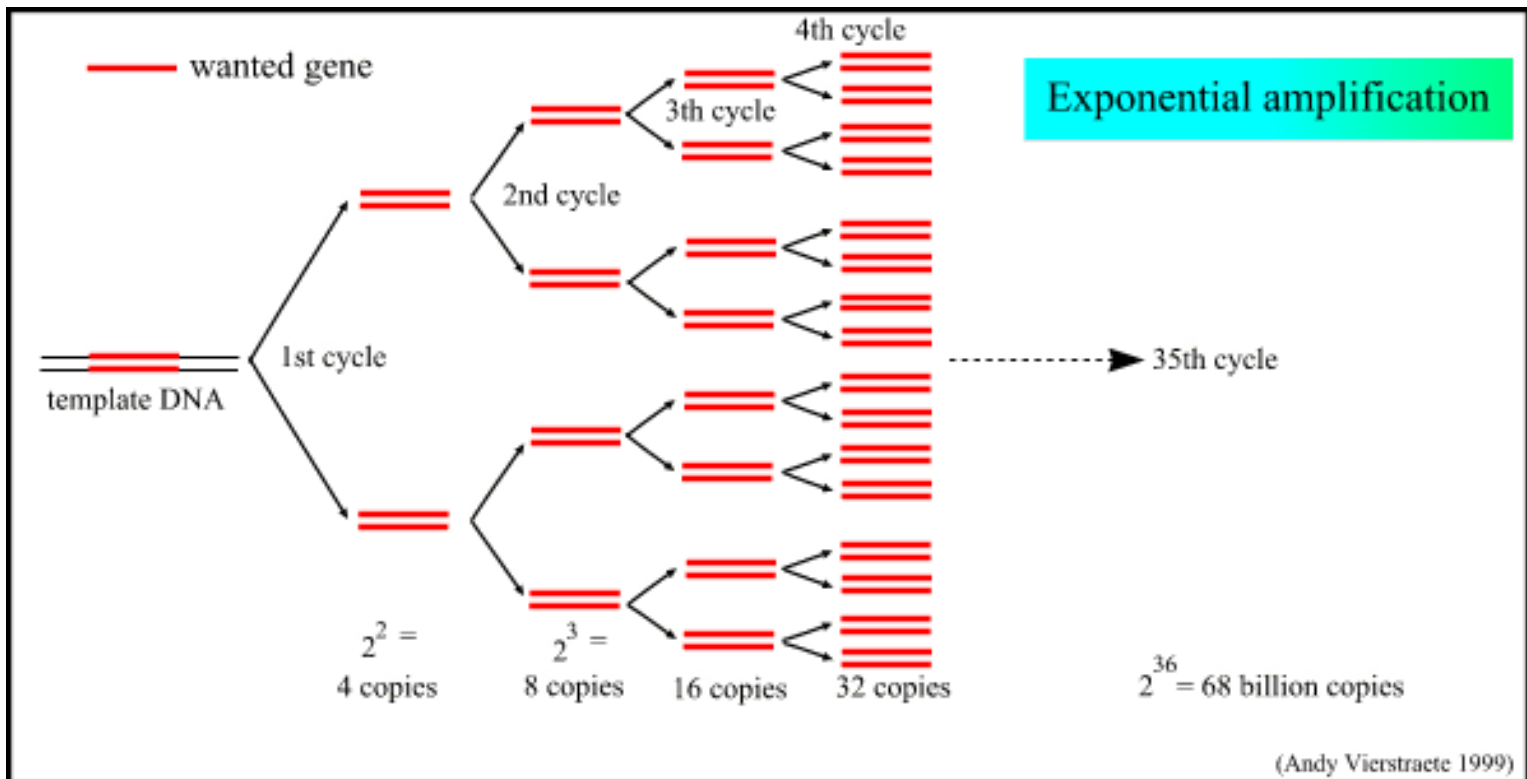
✓ PCR

✓ Ciclo da reação



✓ PCR

✓ Repetição do ciclo



✓ Volume da Reação

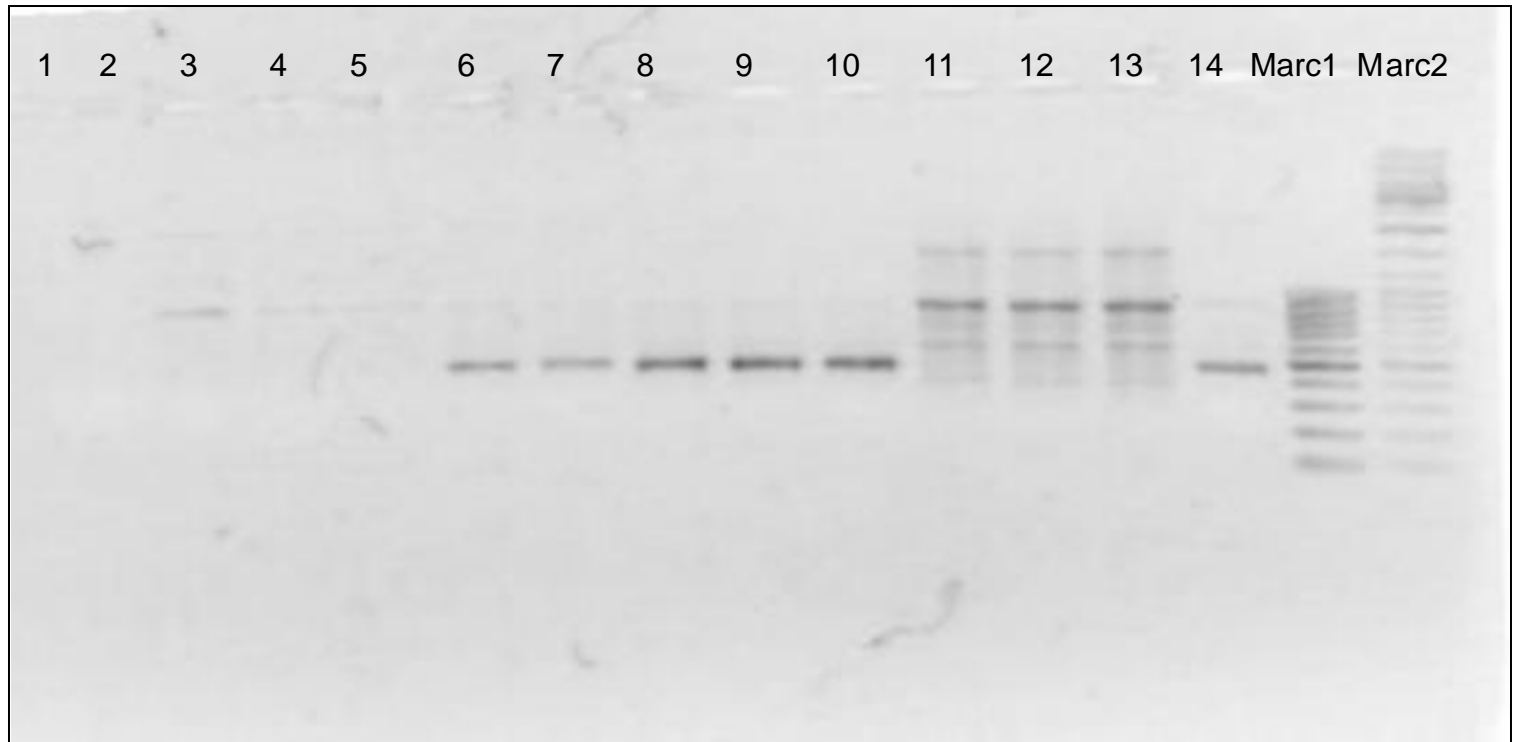
	Vol. (µl)/tubo	Vol. (µl)/6 tubos
H <sub>2</sub> Odd	17,7	106,2
10x Buffer	2,5	15,0
Mgcl <sub>2</sub>	1,5	9,0
dNTPs	0,5	3,0
Primer	1,0	6,0
<i>Taq</i> <sup>®</sup>	0,8	4,8
DNA/ H <sub>2</sub> Odd	1,0	6,0
<b>Total</b>	<b>25,0</b>	<b>150,0</b>

## ✓ Tempo da Reação

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



✓ Eletroforese em gel de agarose



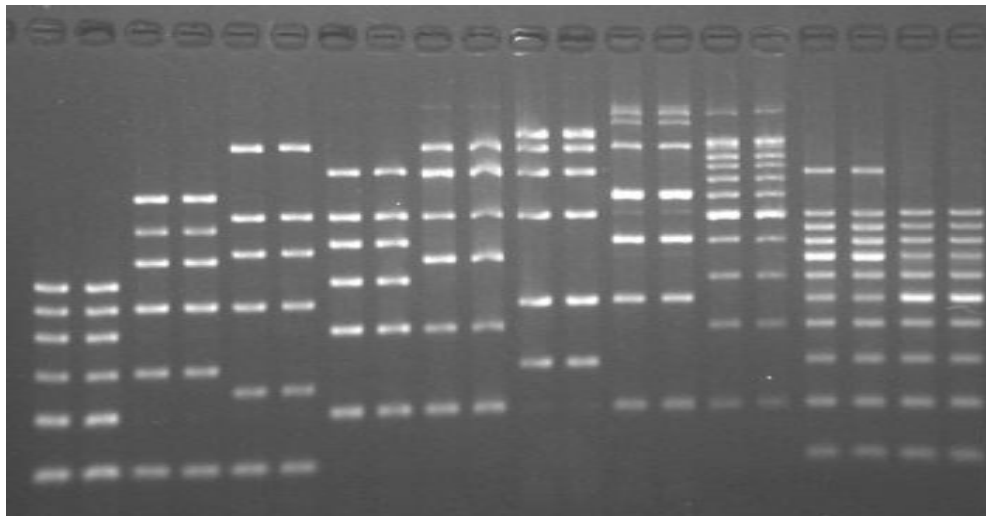
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

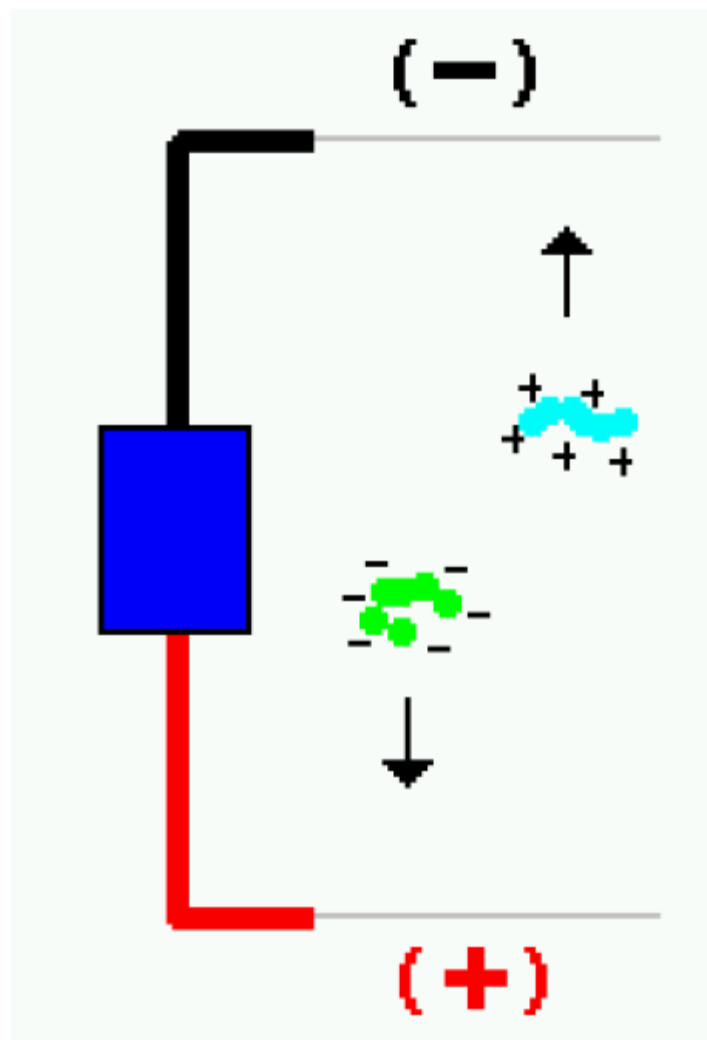


# ELETROFORESE

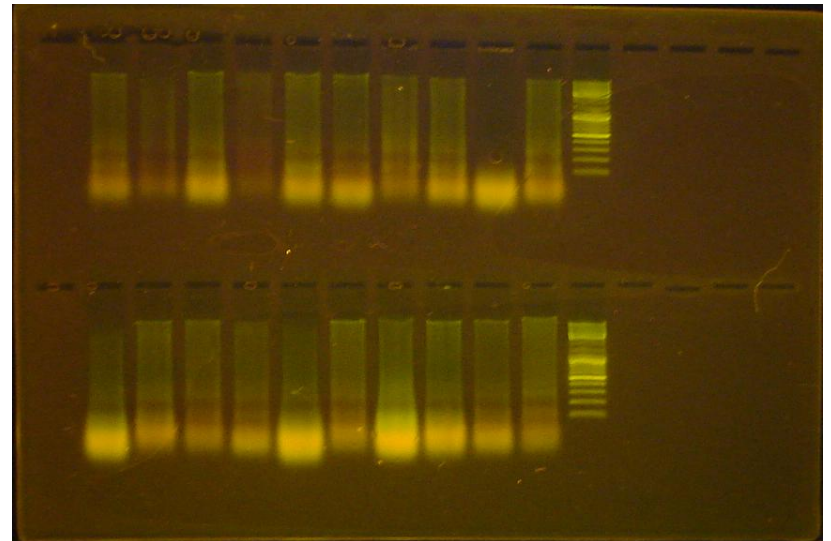
RAFAEL ALDRIGHI TAVARES  
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL

- ✓ 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



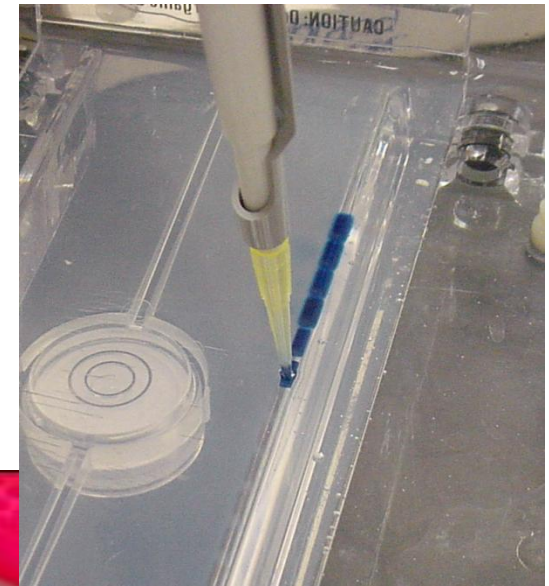
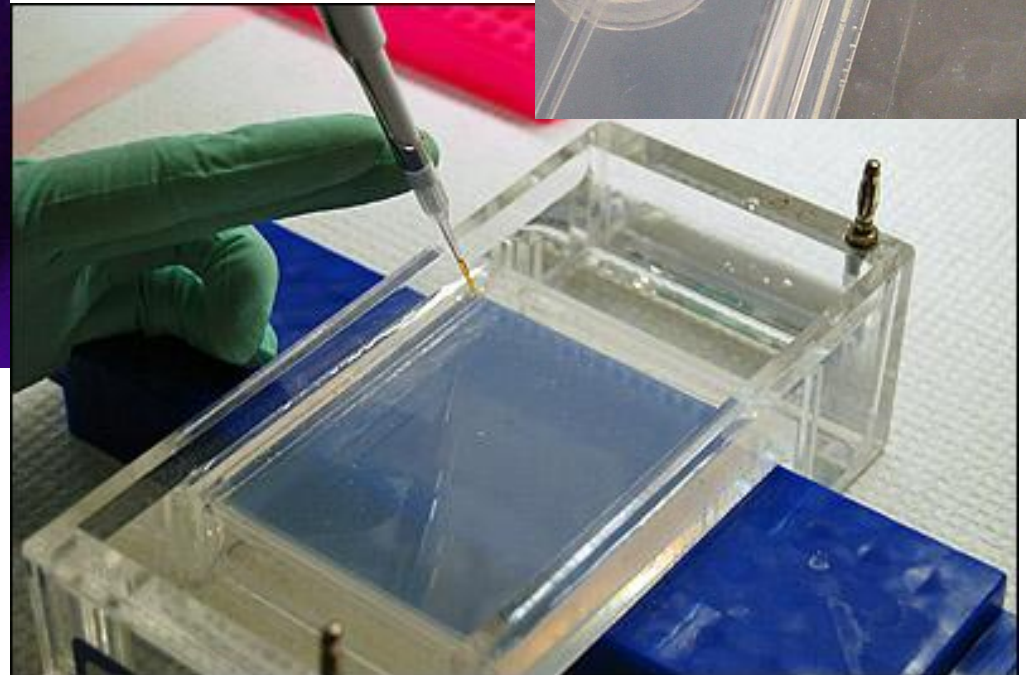
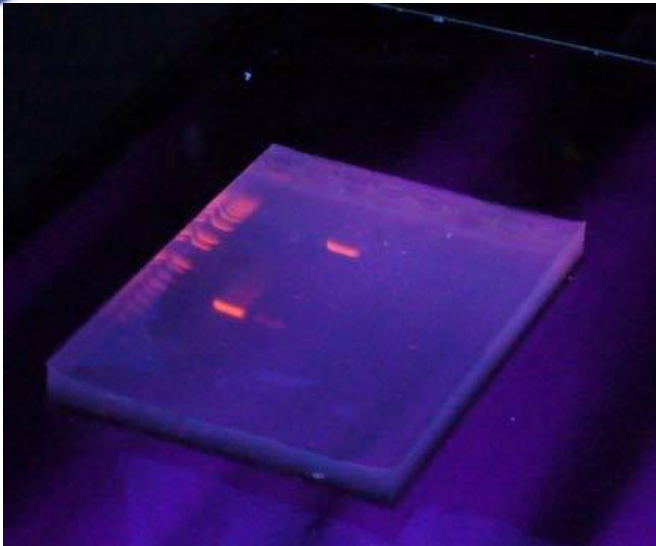


- ✓ Gel de Agarose
  - ✓ Polissacarídeo extraído de alga marinha
  - ✓ concentração 0,5 a 2%
  - ✓ Fácil de preparar
  - ✓ Não – tóxico
  - ✓ Baixa resolução
  - ✓ Voltagem
  - ✓ Horizontal



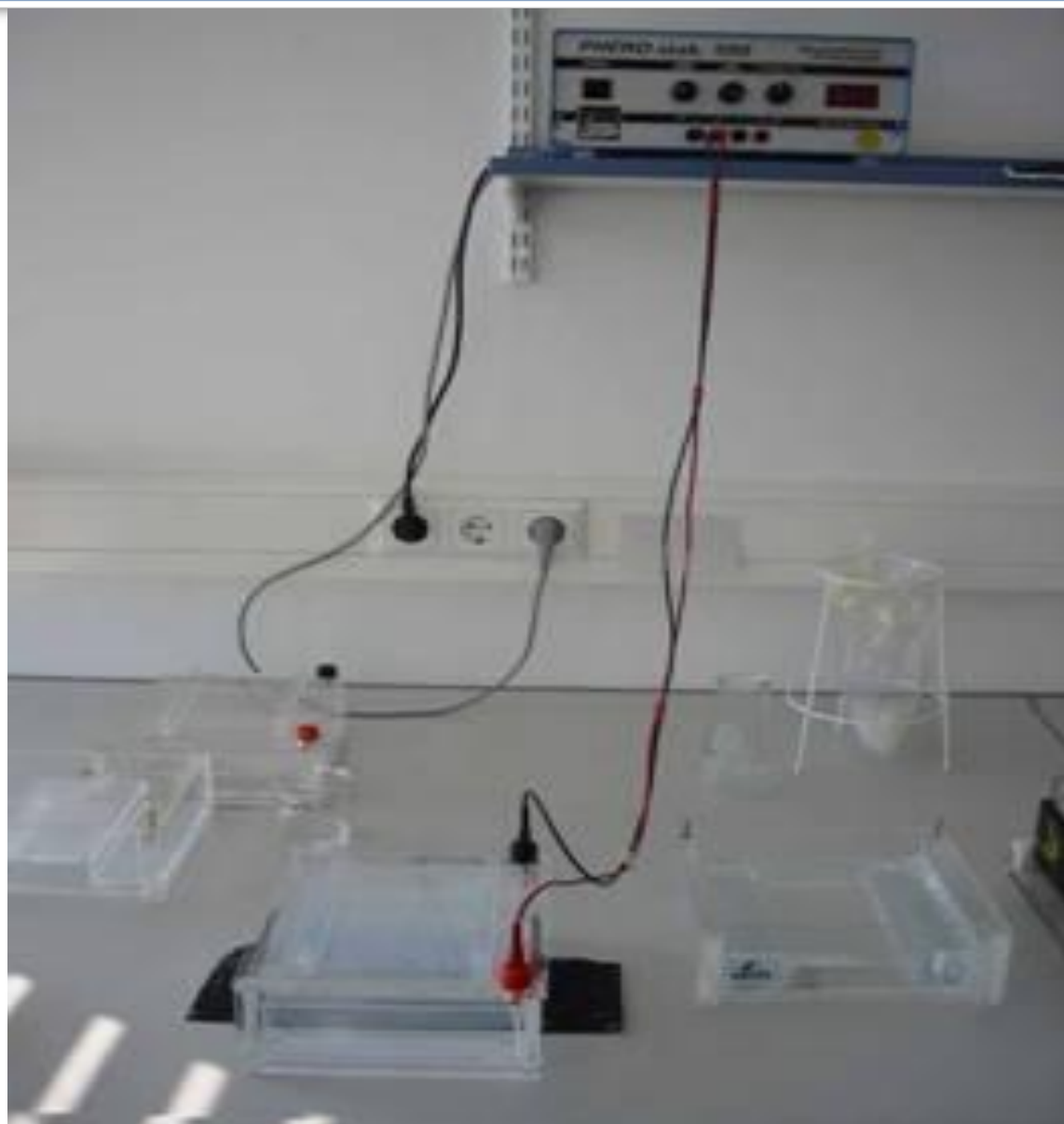
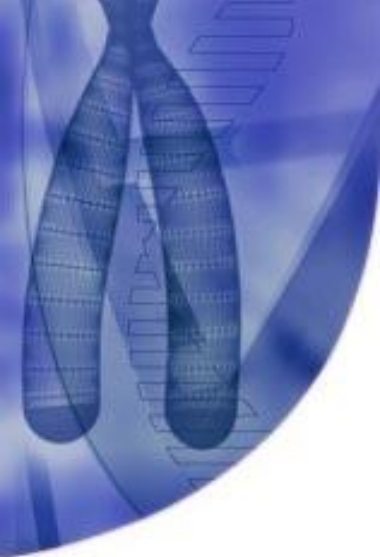
✓ Gel de Agarose

✓ Componentes e equipamentos



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

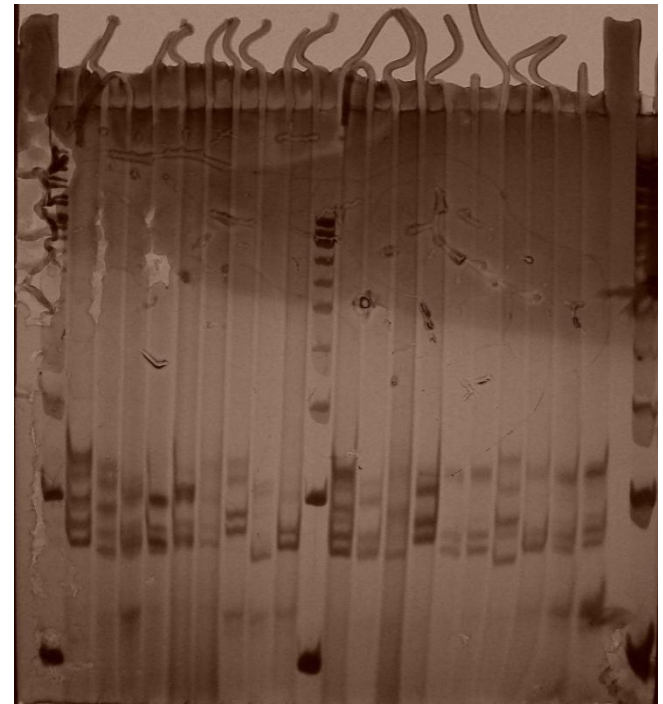




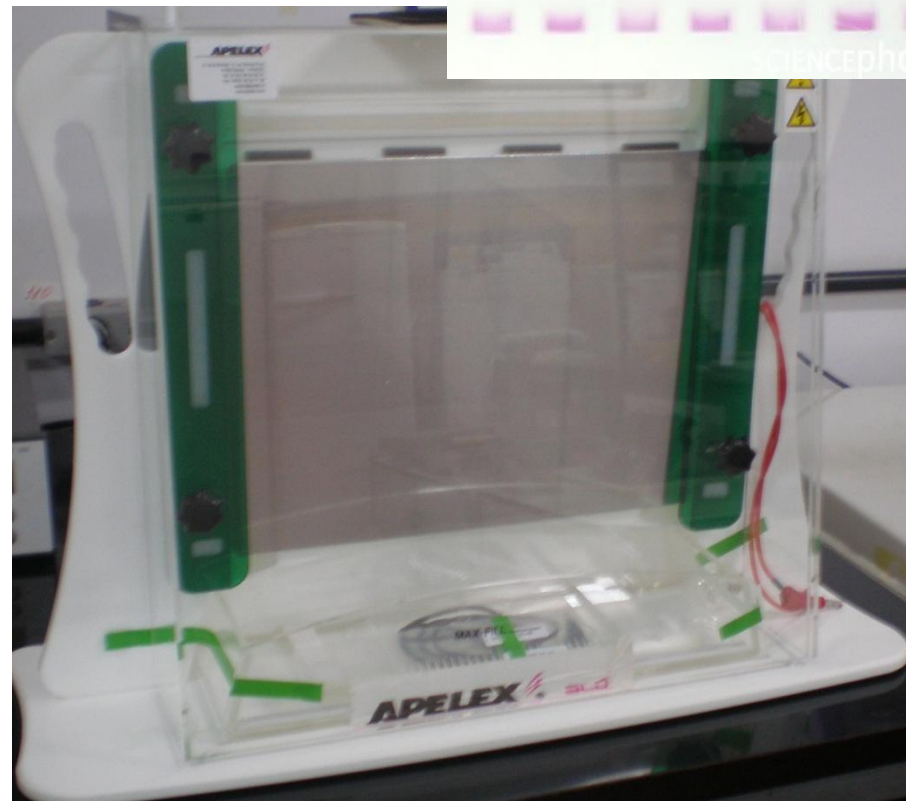
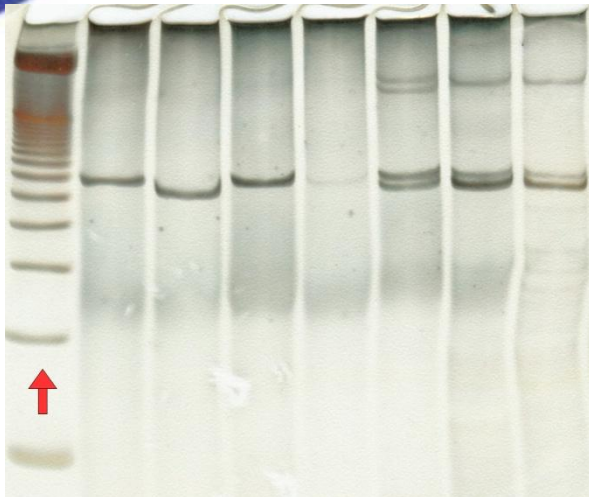
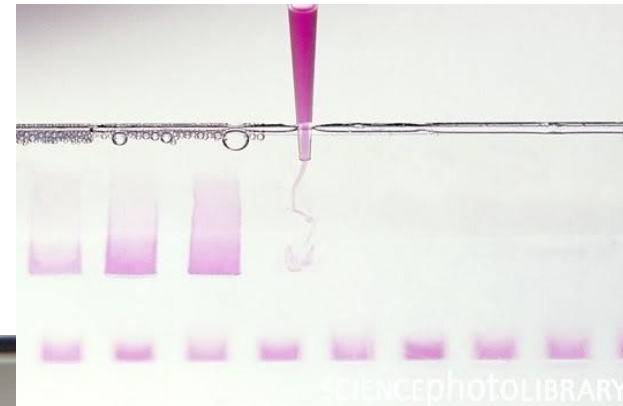


✓ Gel de Poliacrilamida

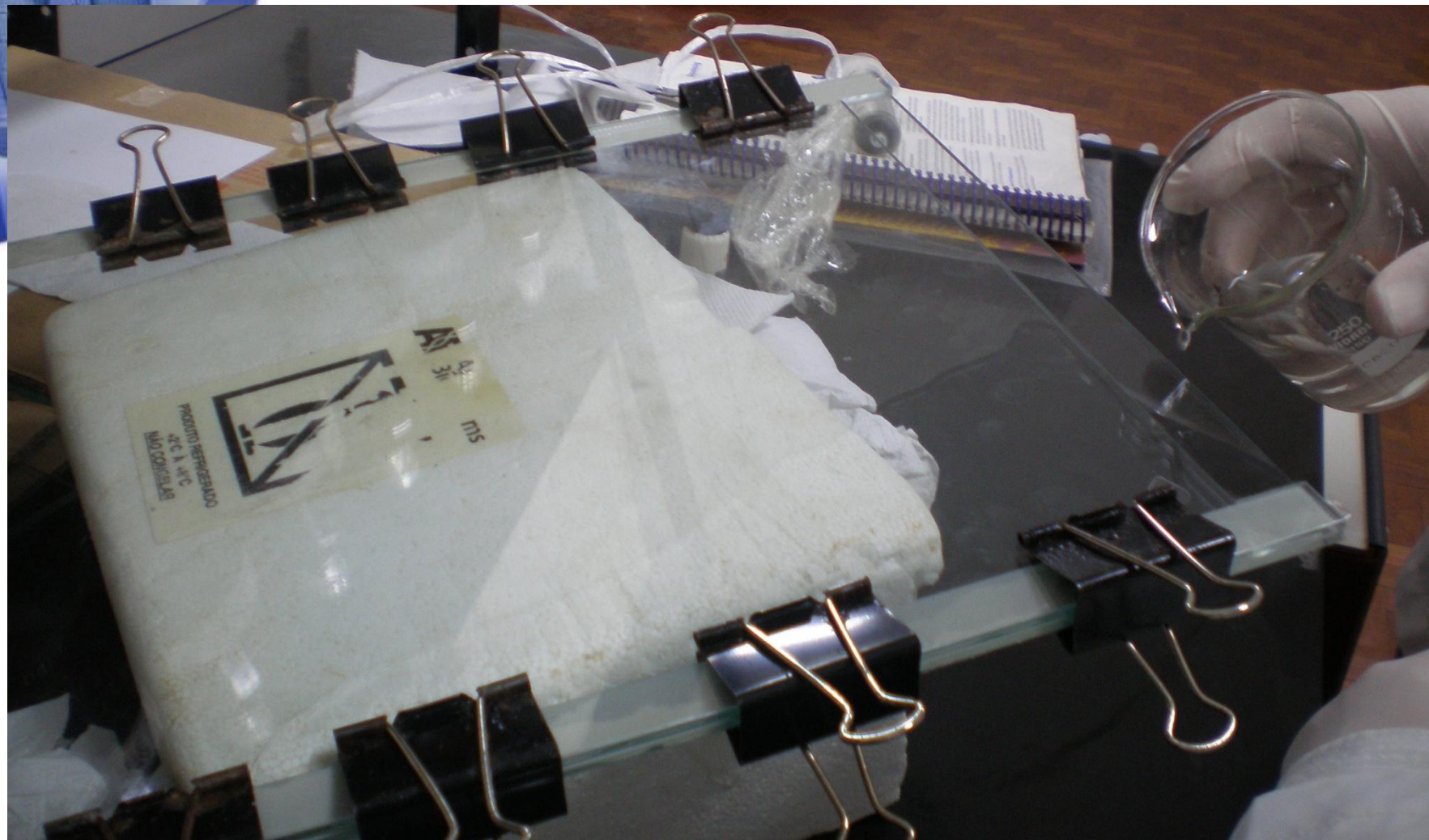
- ✓ Polímero de ligação cruzada de acrilamida e bisacrilamida
- ✓ concentração 3,5 a 20%
- ✓ Difícil de preparar
- ✓ Tóxico - Acrilamida
- ✓ Alta resolução
- ✓ Vertical
- ✓ Desnaturante



- ✓ Gel de Poliacrilamida
- ✓ Componentes e equipamentos

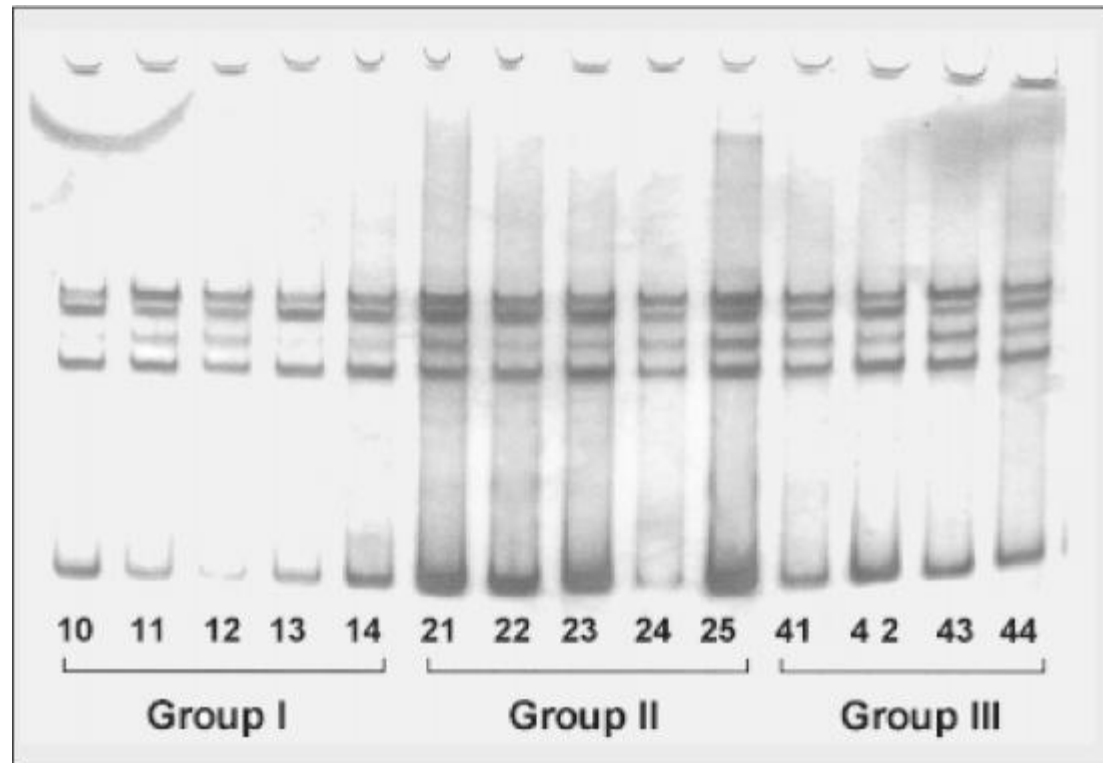


- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Tampão
- Corante de DNA
- Buffer
- DNA/Marcador



✓ Gel de Poliacrilamida Desnaturante

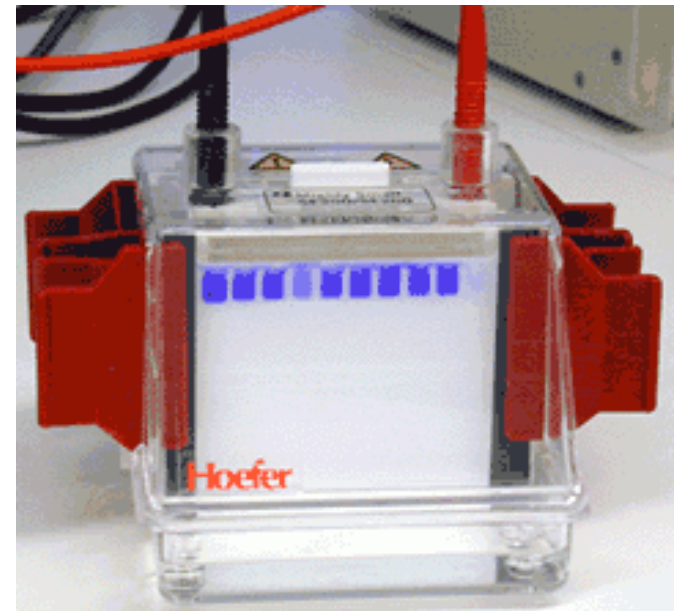
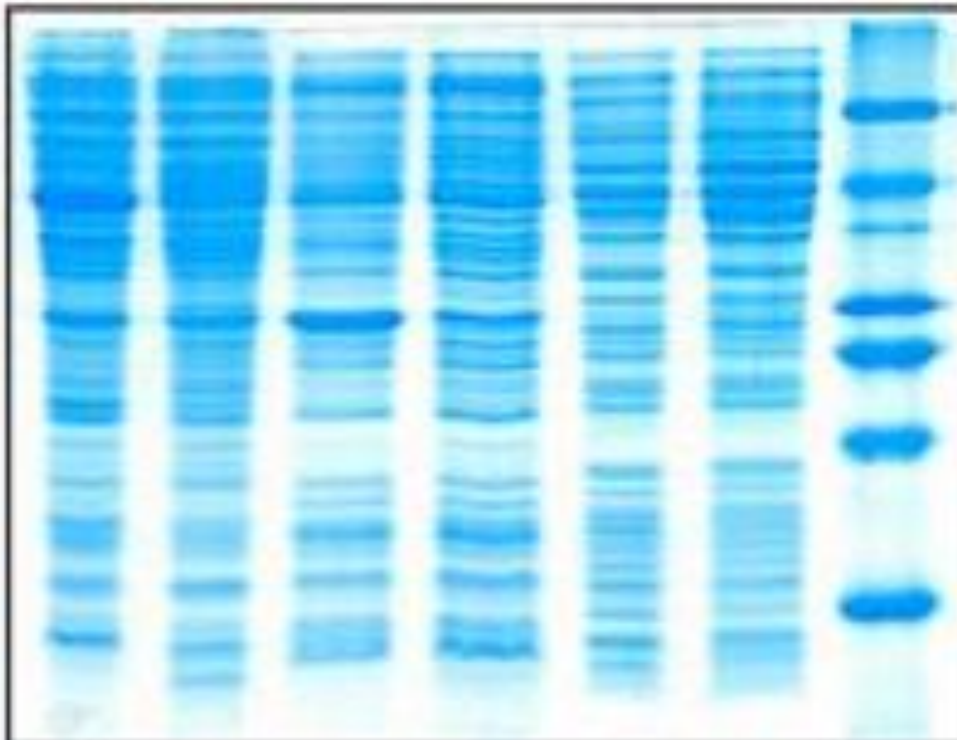
- ✓ Separação em fita simples
- ✓ Uréia
- ✓ Desnaturação 94°



**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



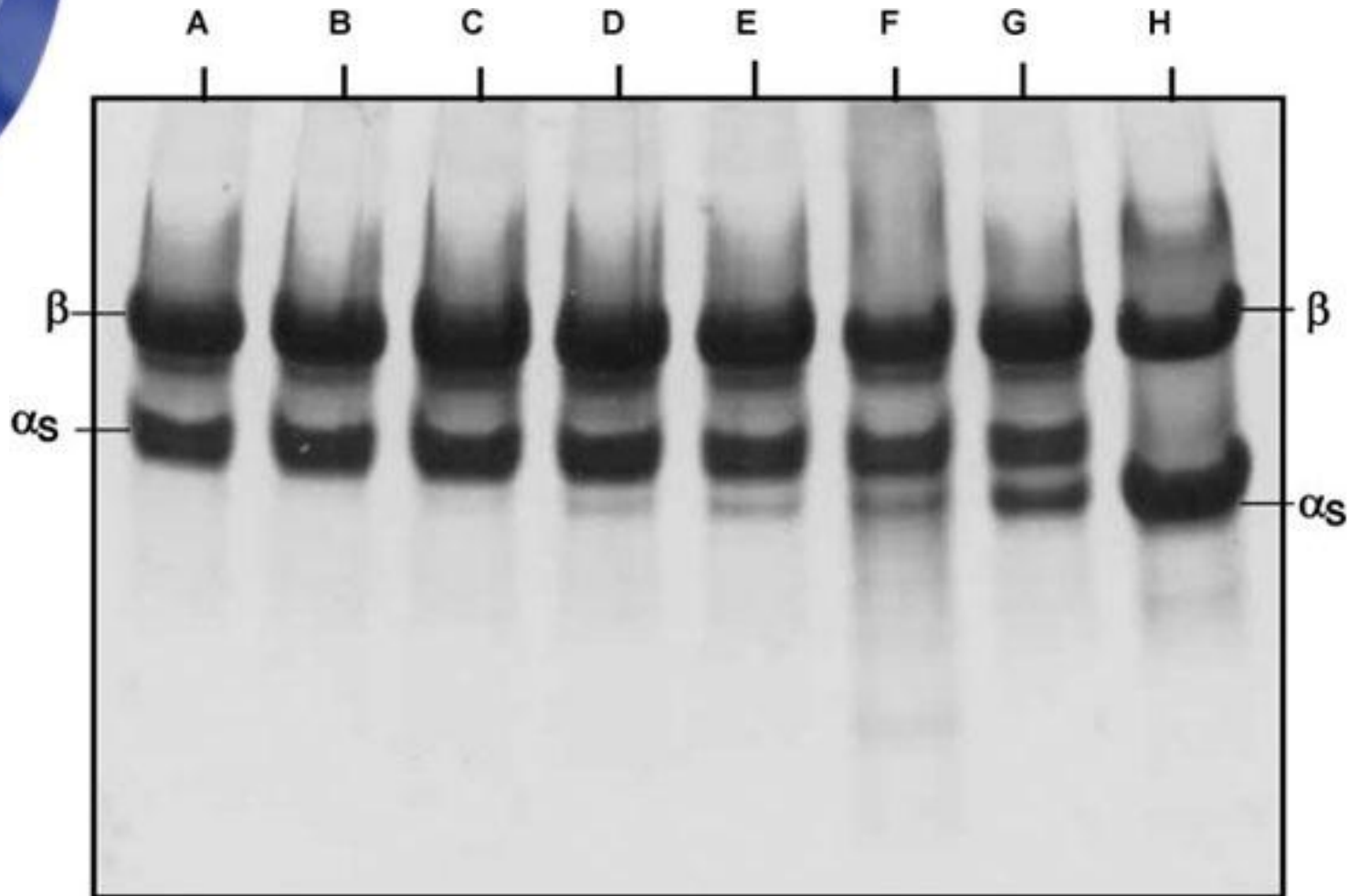
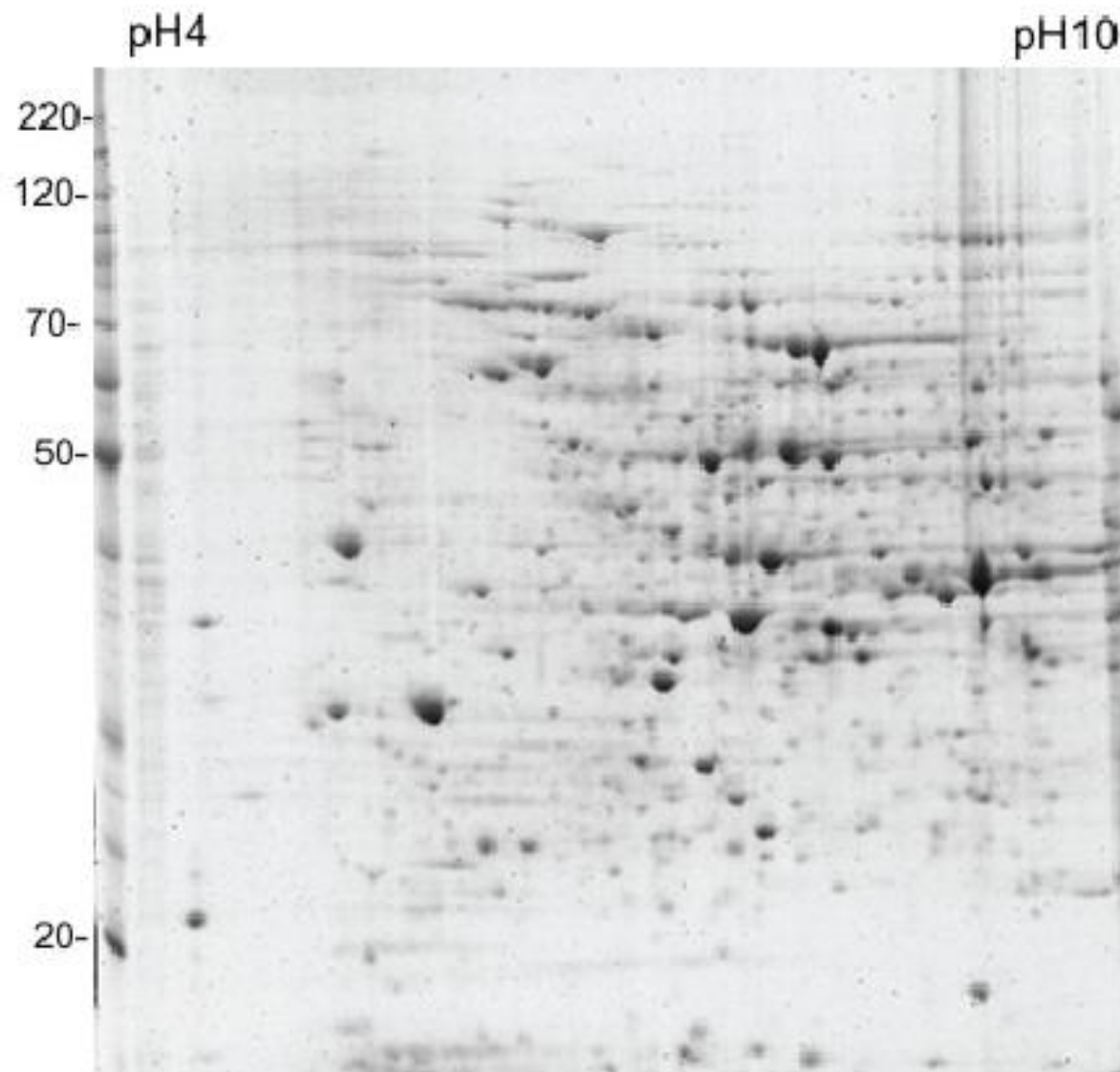
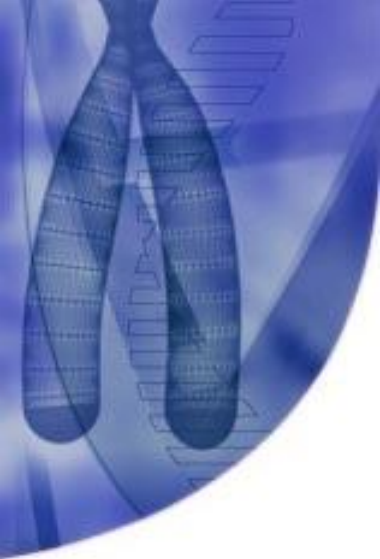


Figura 3. Perfil eletroforético (uréia-PAGE) da simulação de fraude do leite de cabra com leite de vaca. (A) 100% de leite caprino, (H)100% de leite bovino e misturas contendo 0,5 % (B), 1% (C), 2,5% (D), 5% (E), 10% (F), 25% (G) de leite bovino.

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

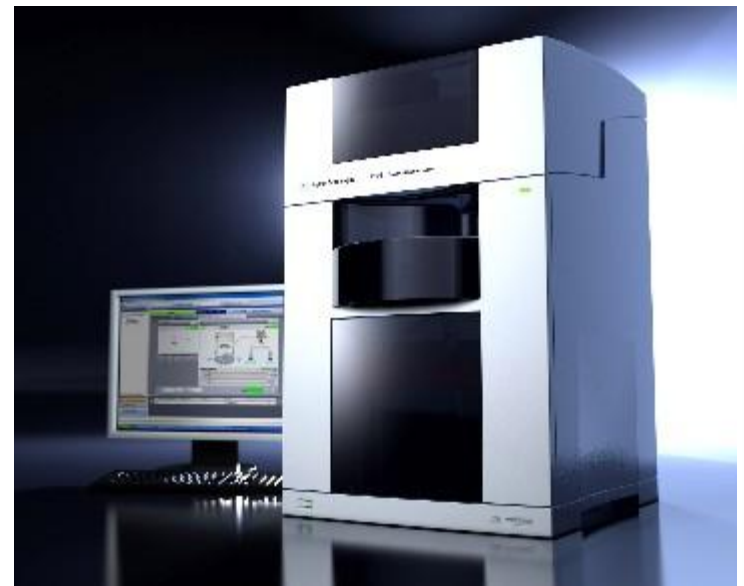




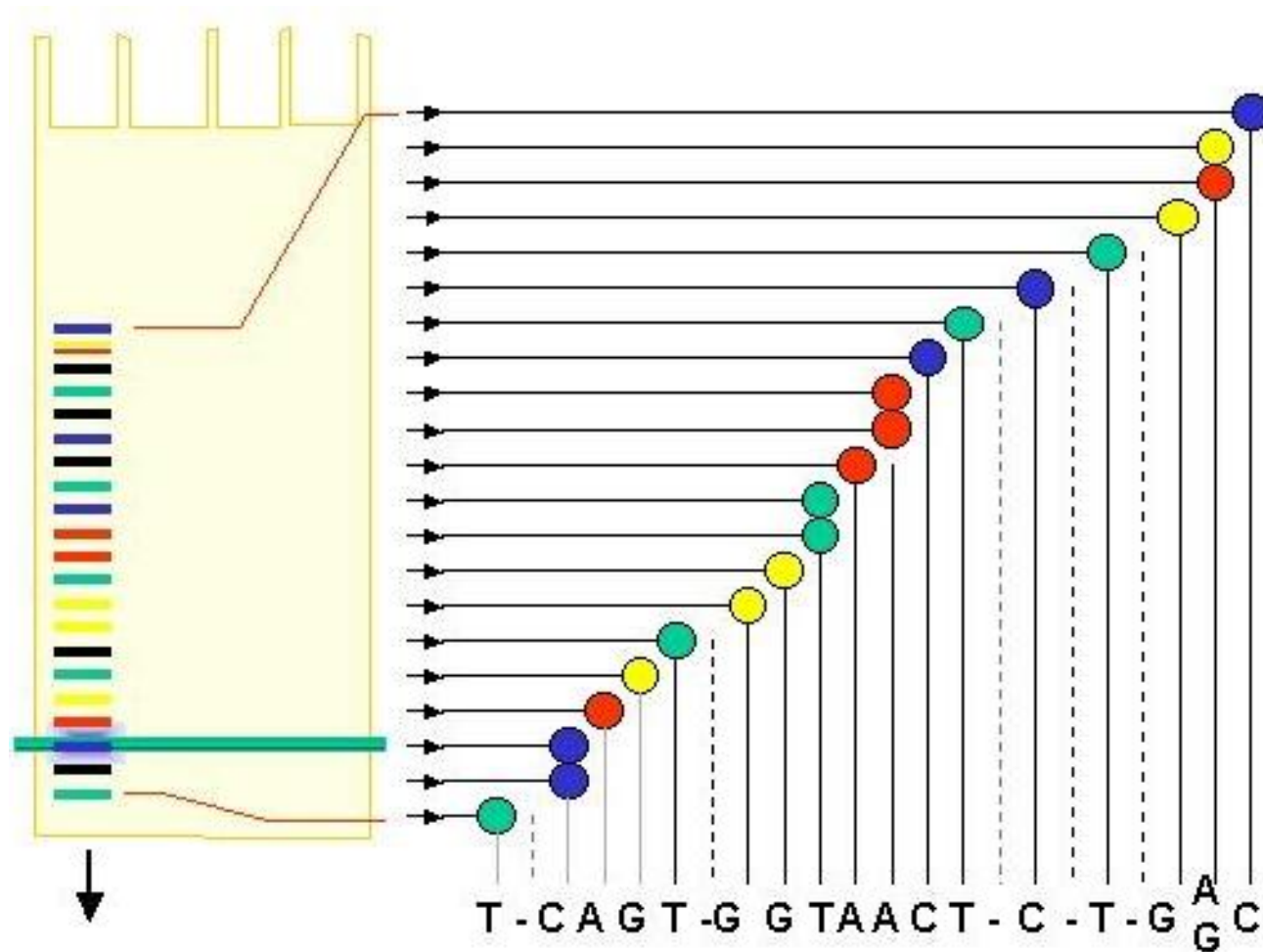


✓ **Eletroforese Capilar**

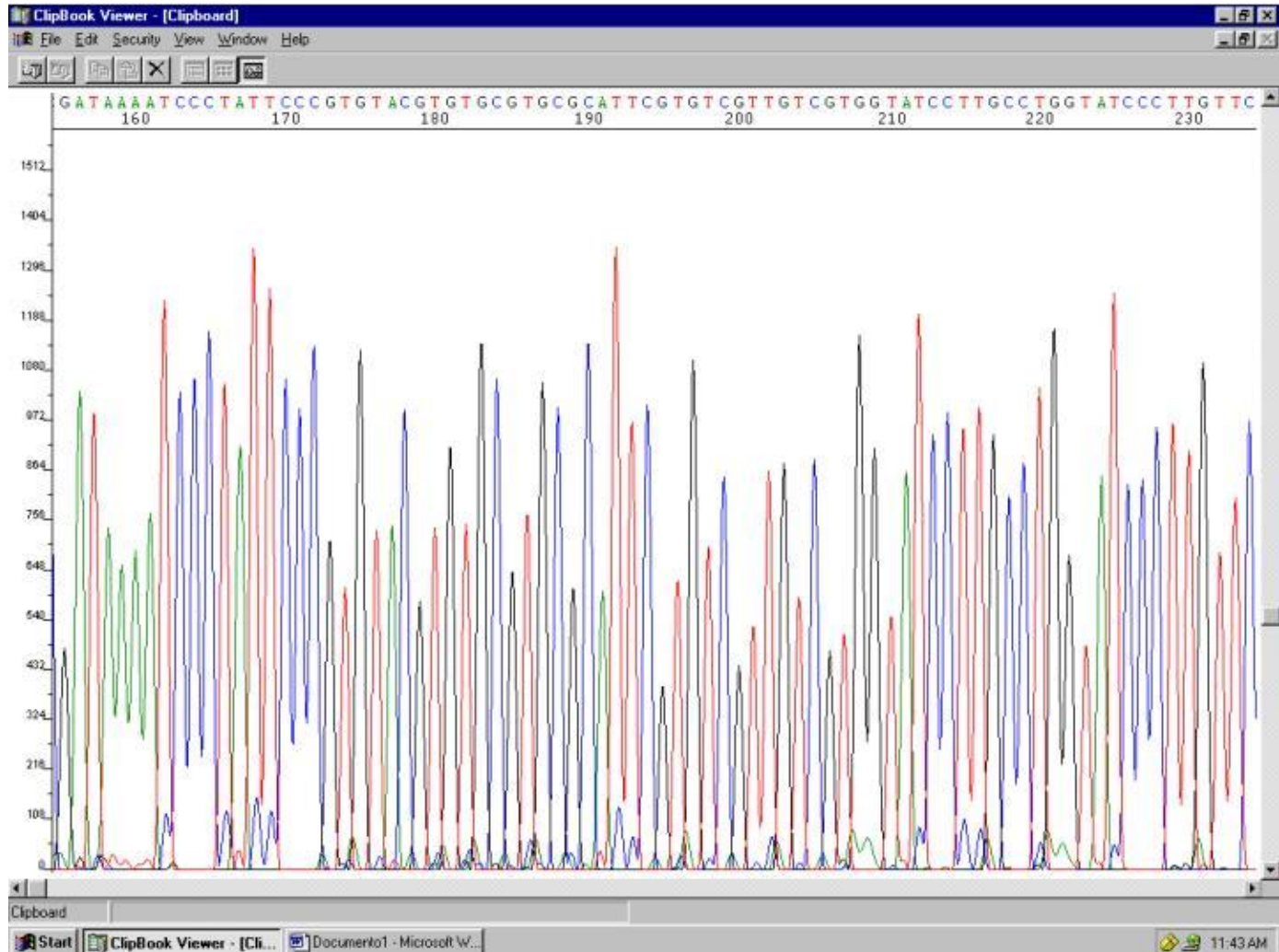
- ✓ Migração em alta velocidade
- ✓ Diminuição do efeito joule
- ✓ Grande Resolução
- ✓ Pouco volume de amostra
- ✓ Sequenciamento



✓ Eletroforese Capilar



✓ Eletroforese Capilar



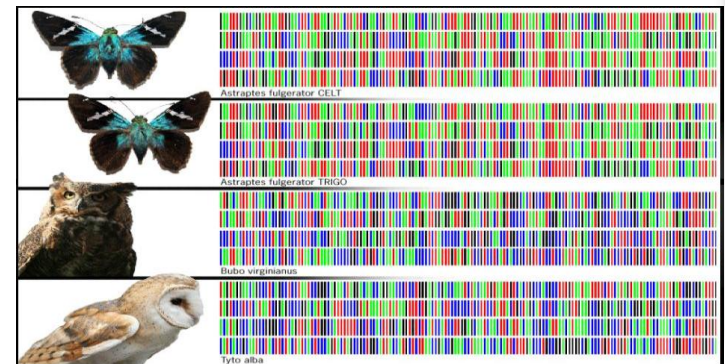
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



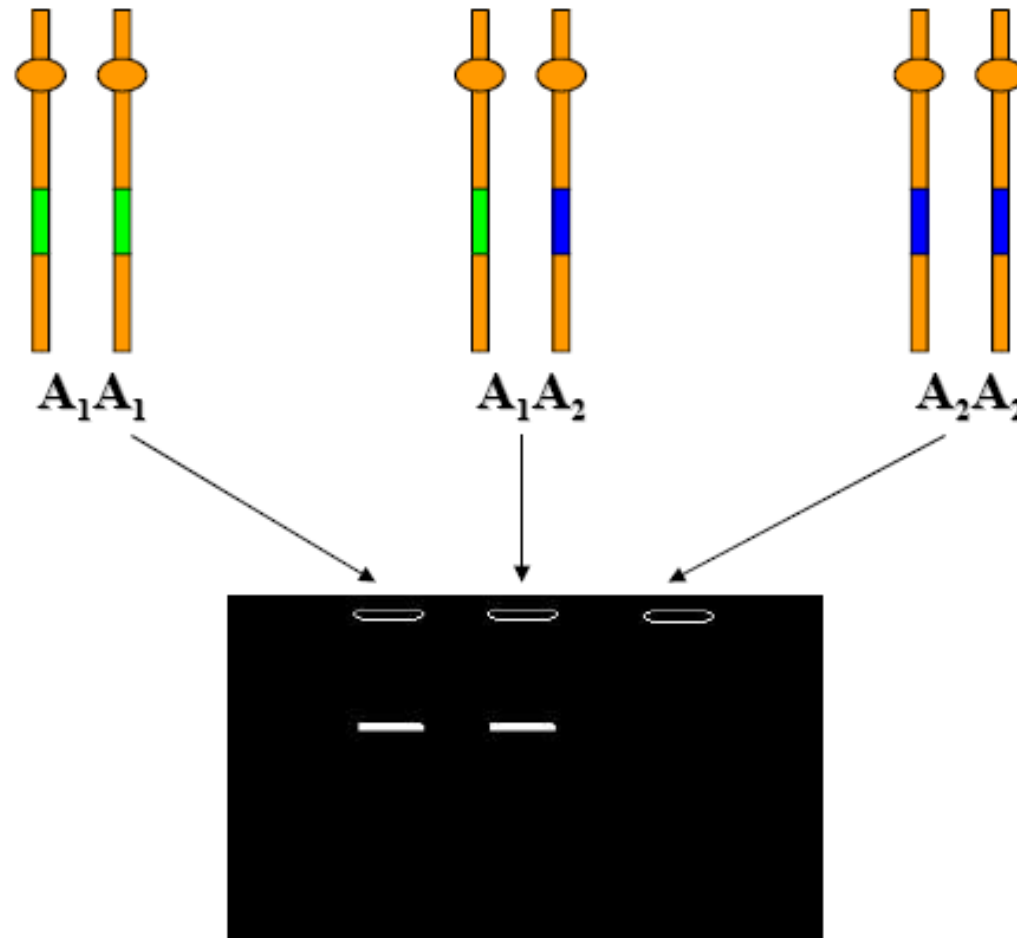
# Marcadores Genéticos

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES  
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA GENÉTICA ANIMAL

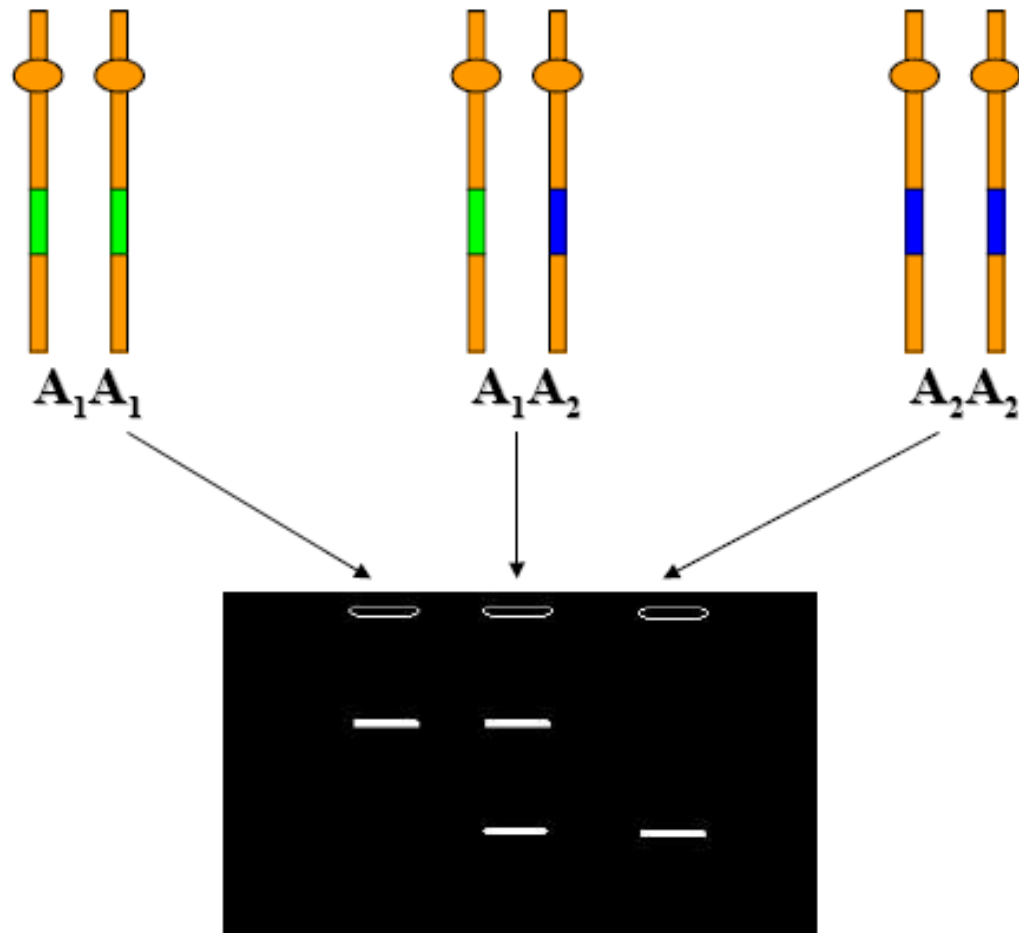
- ✓ Característica que é capaz de detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos.
  - ✓ capaz de diferenciar os progenitores.
  - ✓ reproduzido com precisão na progênie.
- ✓ Marcador genético (ou *locus* marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo.
  - ✓ 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





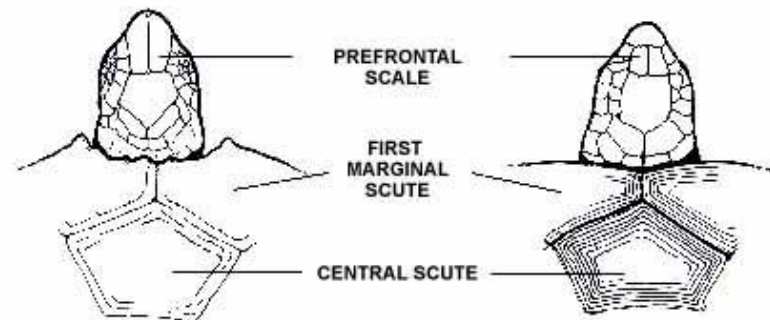
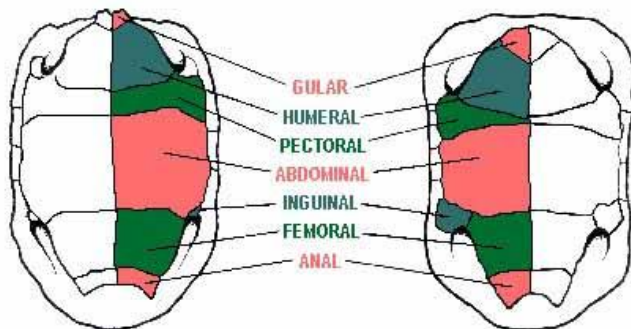
✓ Marcadores Morfológicos

✓ Genes associados a caracteres morfológicos, onde características fenotípicas de variação discreta são utilizadas como marcadores morfológicos.

✓ Fenótipos de fácil identificação visual.

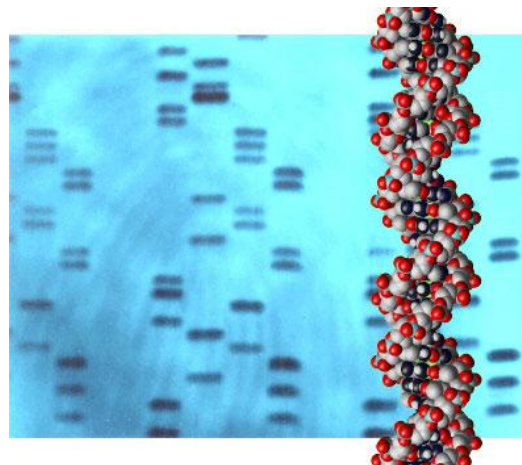
✓ Identificado somente após a expressão do fenótipo.

✓ 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

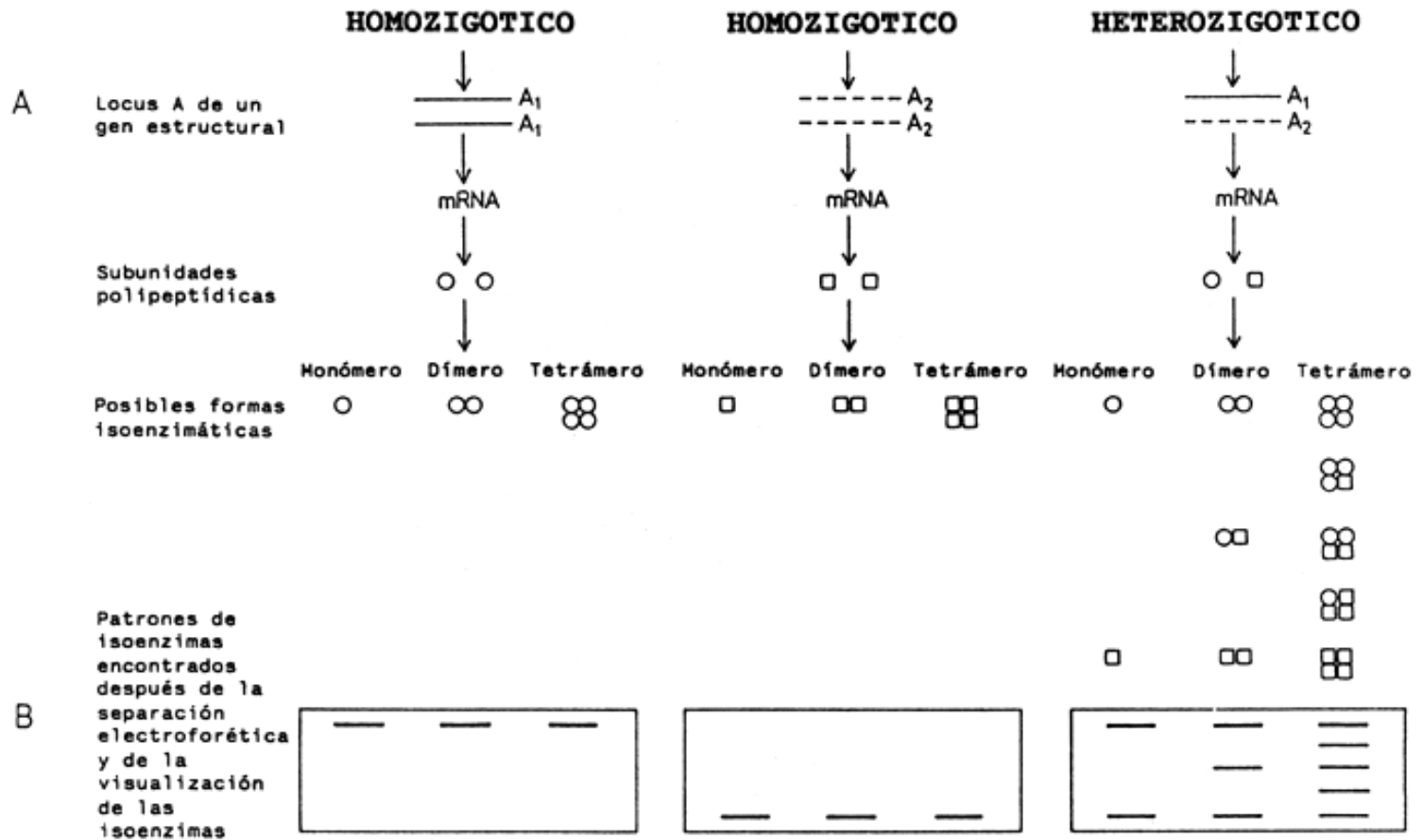
✓ Isoenzimas

***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

---

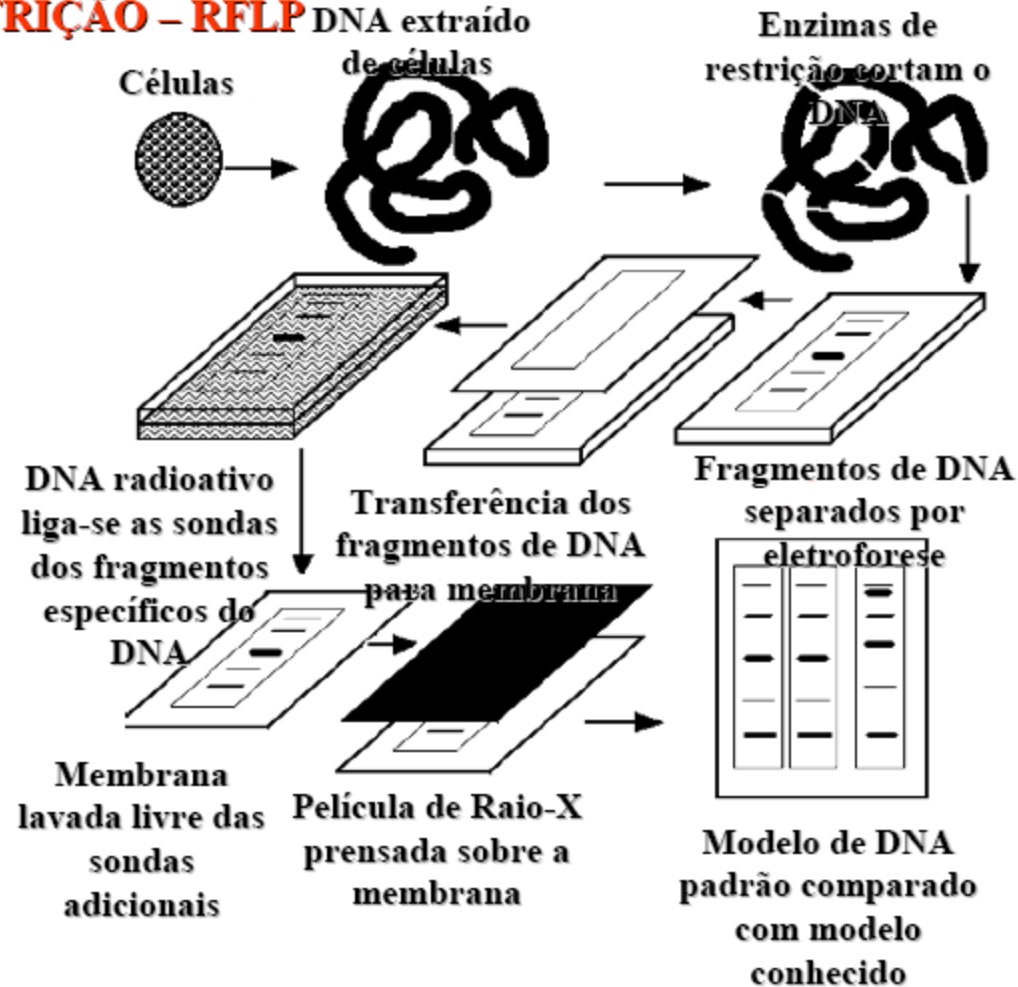
✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ **RFLPs**

***Detecção***

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

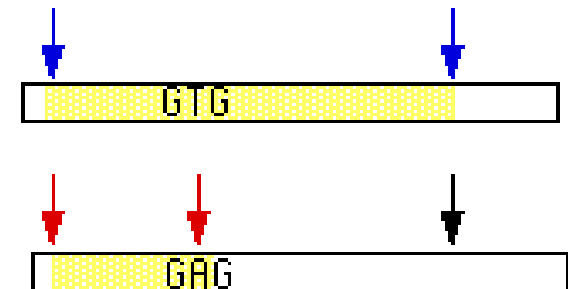
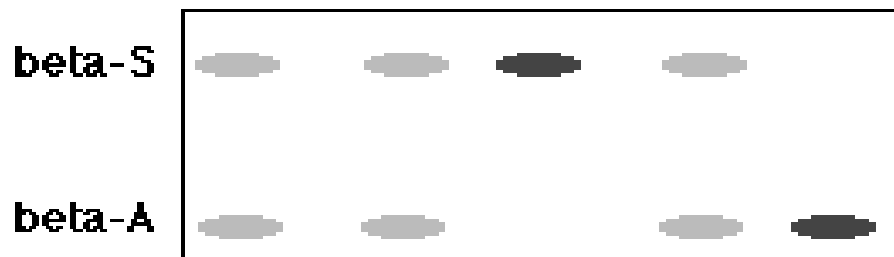
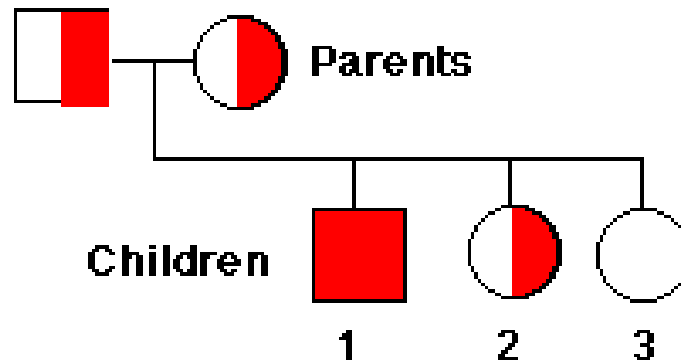
## **POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO – RFLP**





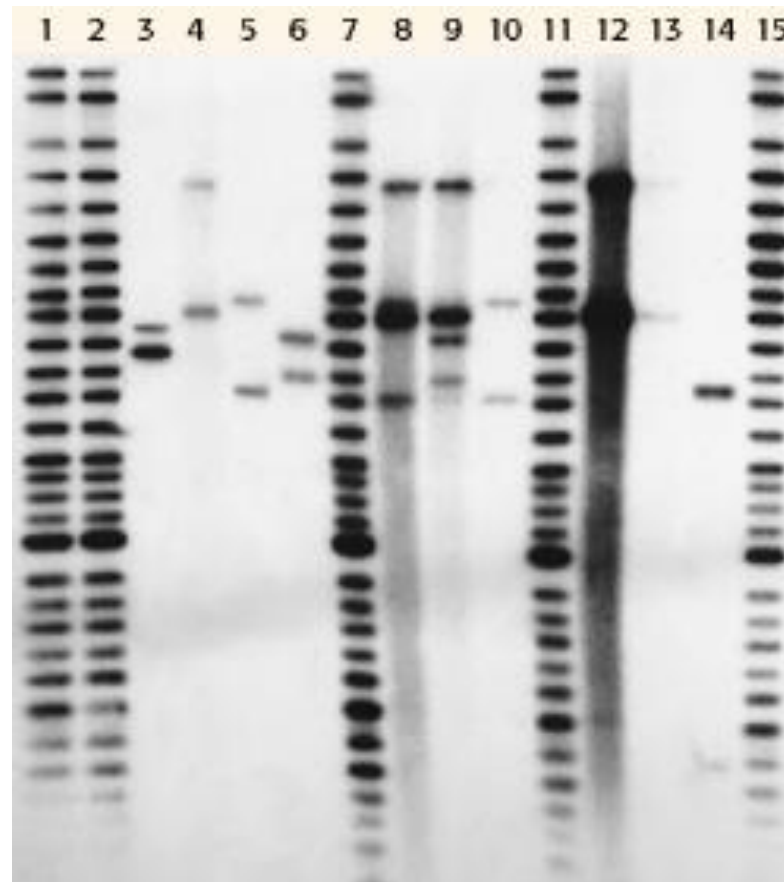
✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ RFLPs



✓ Marcadores Moleculares - Restrição e hibridação

✓ RFLPs



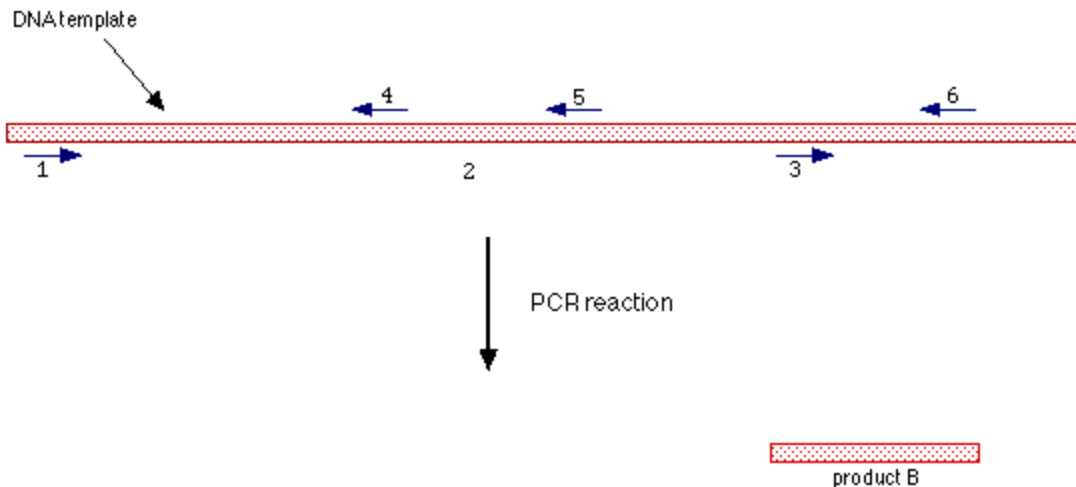
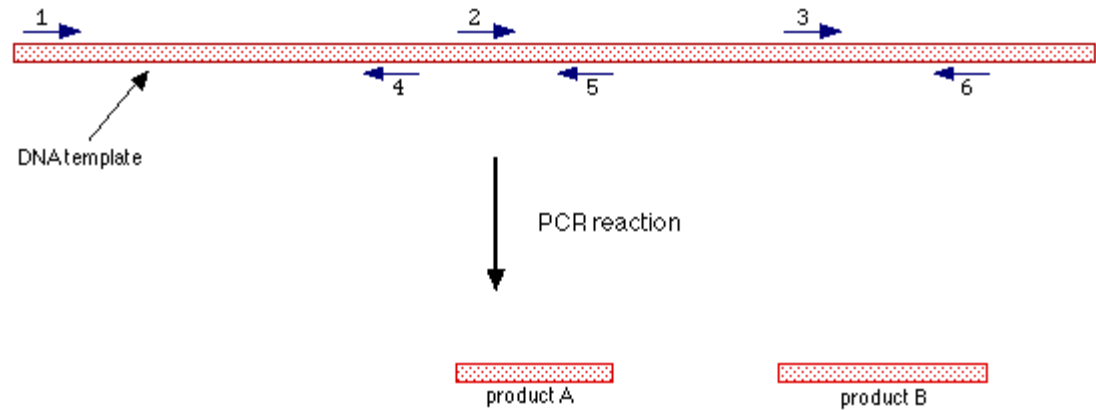
✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **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*
-

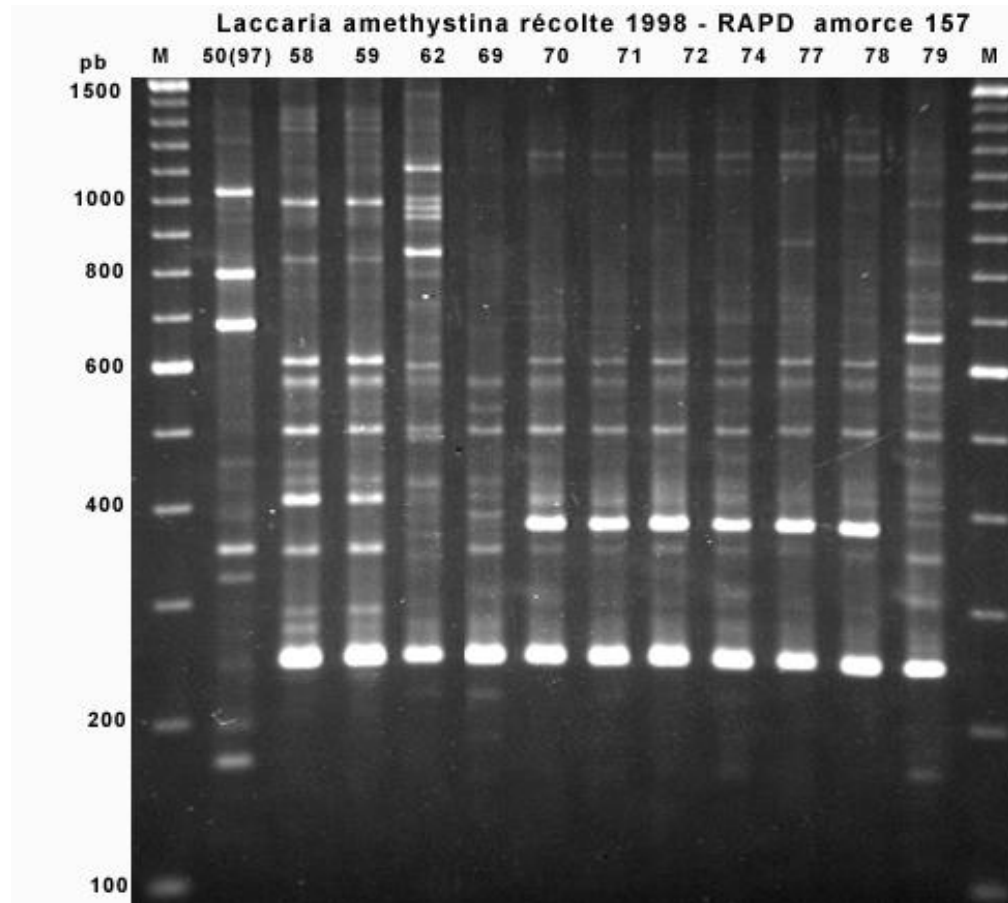
✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA**




✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

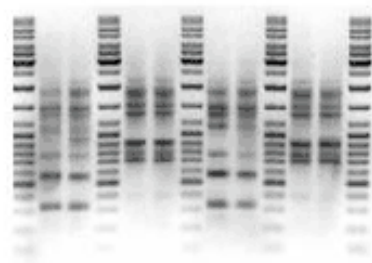
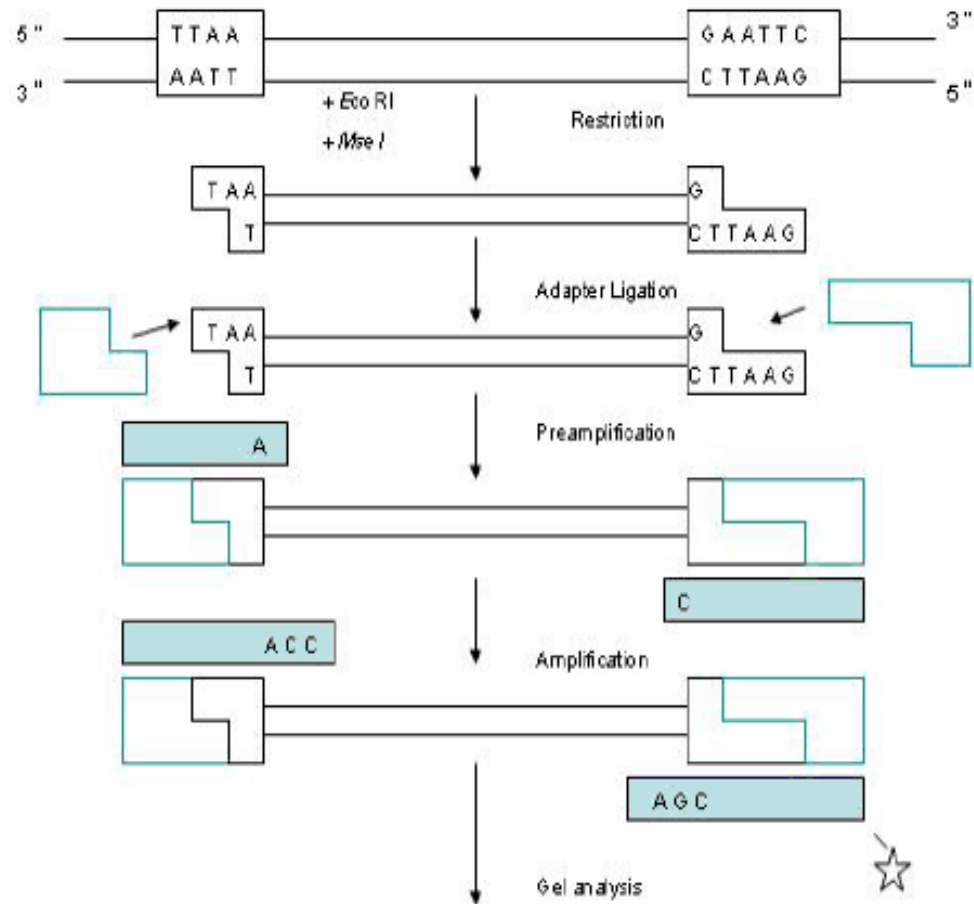
✓ **RAPD - *Randomly Amplified Polymorphic DNA***

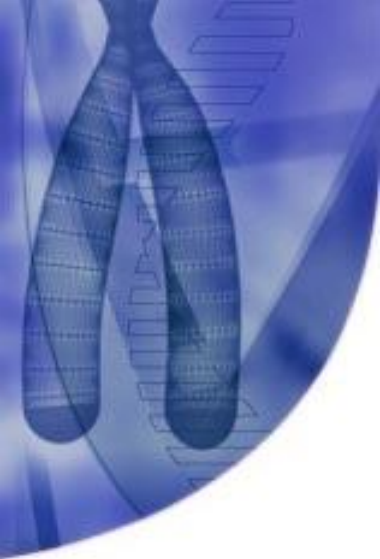


✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **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.
- 
- 

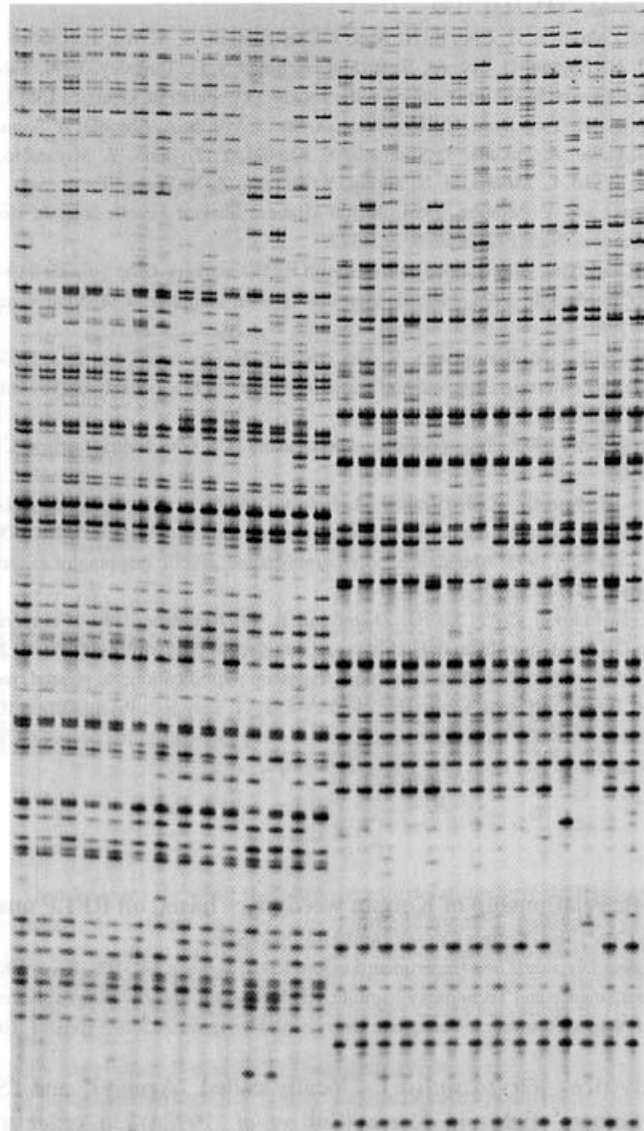




92S04/02G12

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

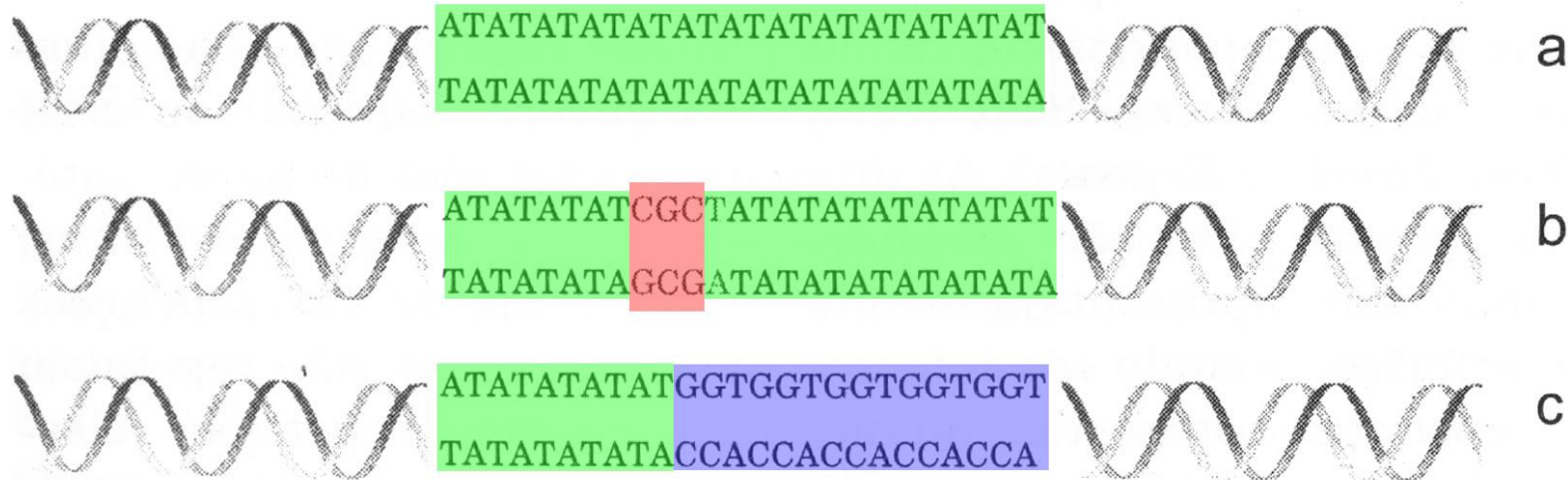
✓ **Microssatélites**

- 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.
-

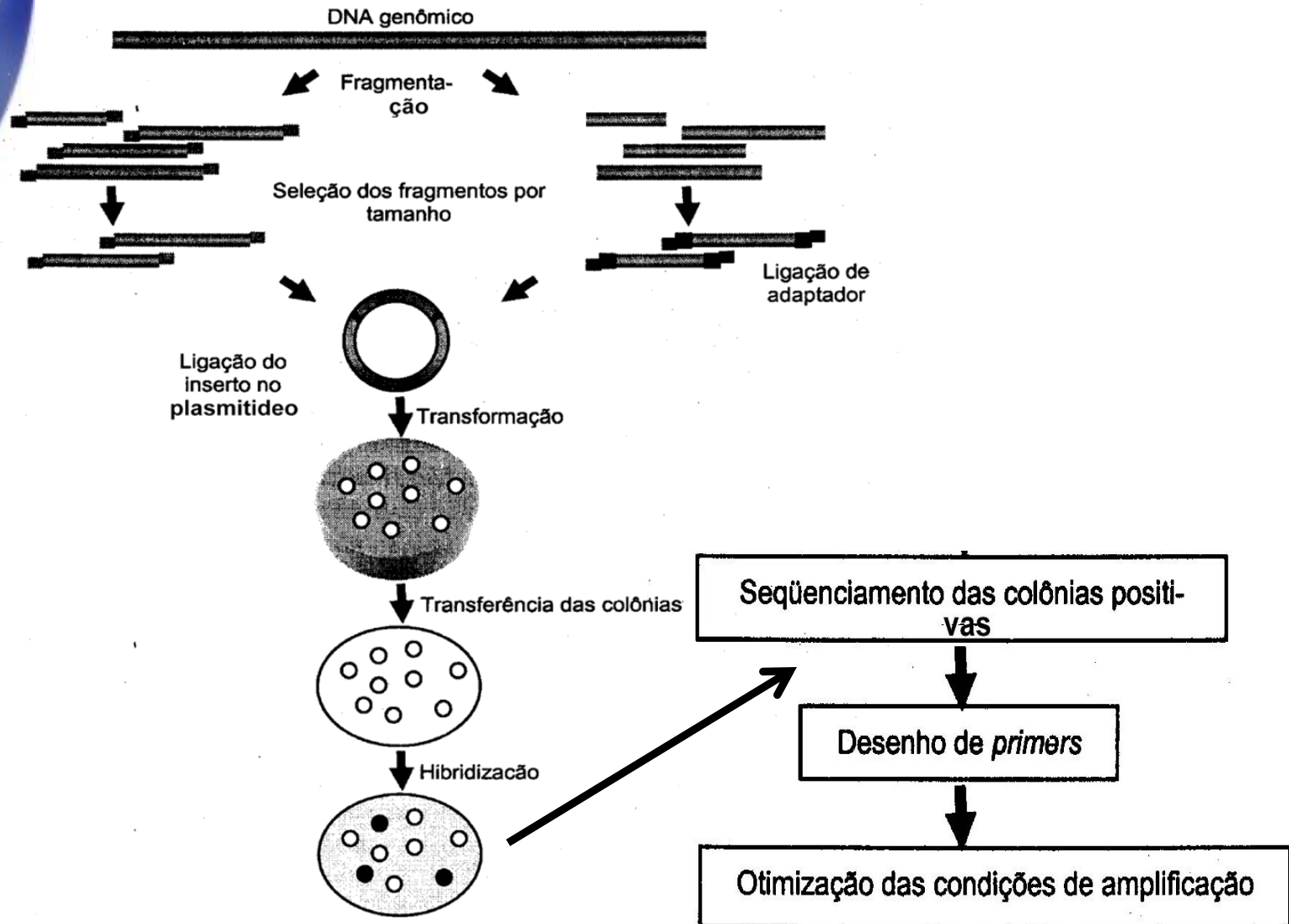


✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **Microssatélites**

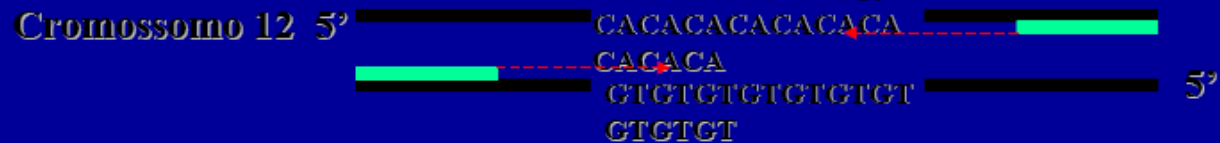


➤ Também são classificados conforme a unidade repetida em:  
mononucleotídica (A) $n$ ; dinucleotídica (AT) $n$ ; trinucleotídica (ATG) $n$ ;  
Tetranucleotídica (ATGA) $n$ ; Pentanucleotídica (ATGC) $n$ ; e  
hexanucleotídica (ATGCT) $n$

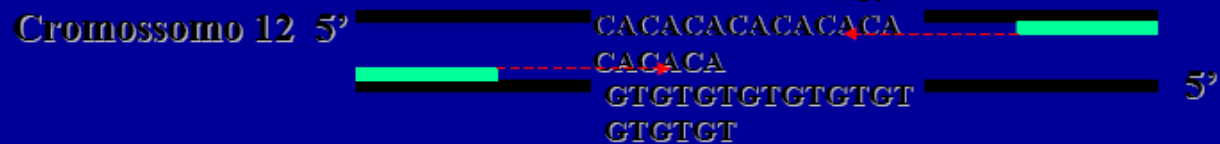


### Indivíduo homozigoto $(CA)_{10}/(CA)_{10}$

#### Alelo $(CA)_{10}$

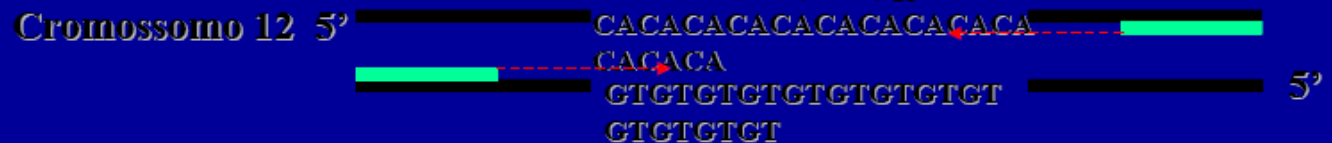


#### Alelo $(CA)_{10}$

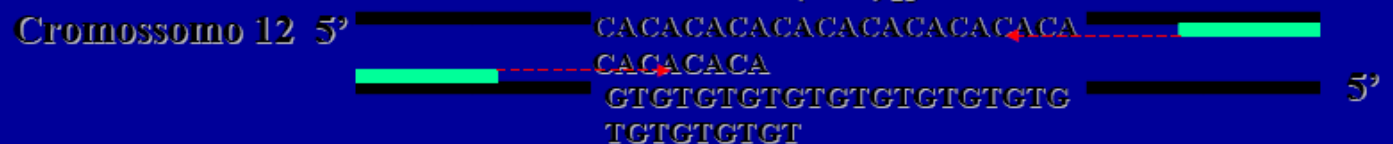


### Indivíduo heterozigoto $(CA)_{13}/(CA)_{15}$

#### Alelo $(CA)_{13}$



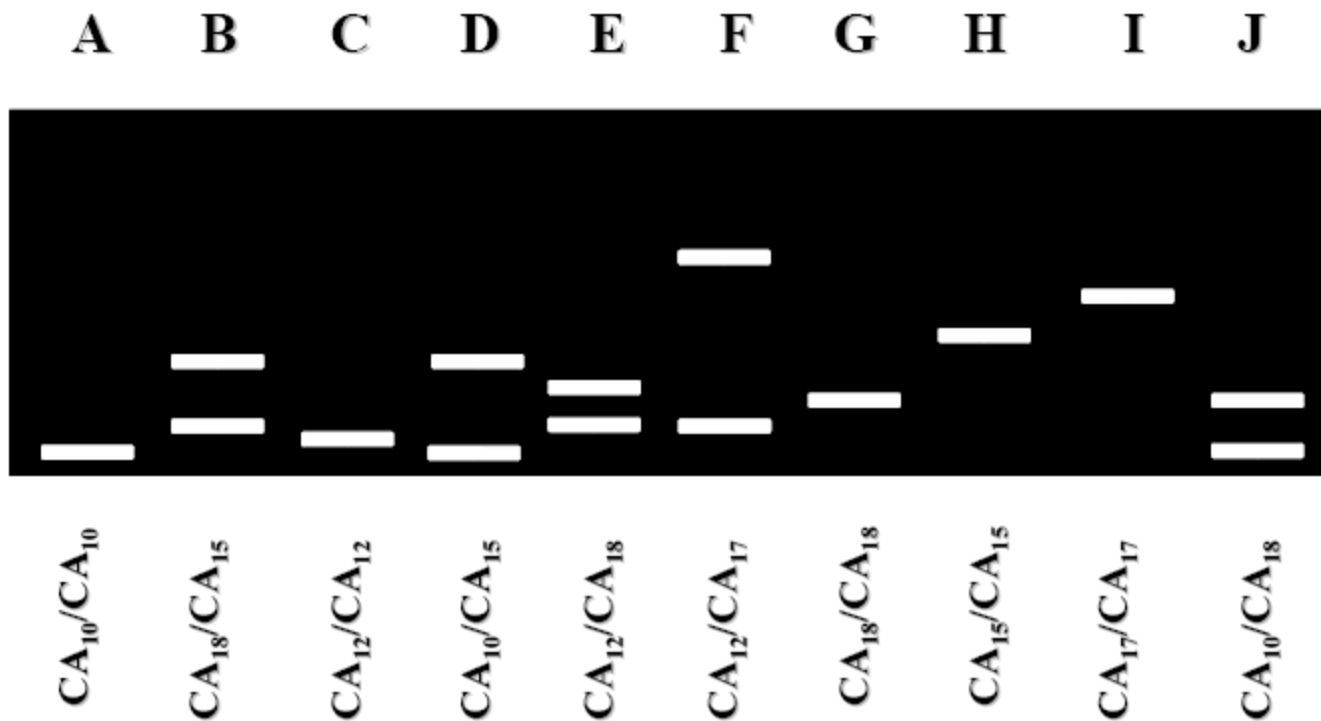
#### Alelo $(CA)_{15}$

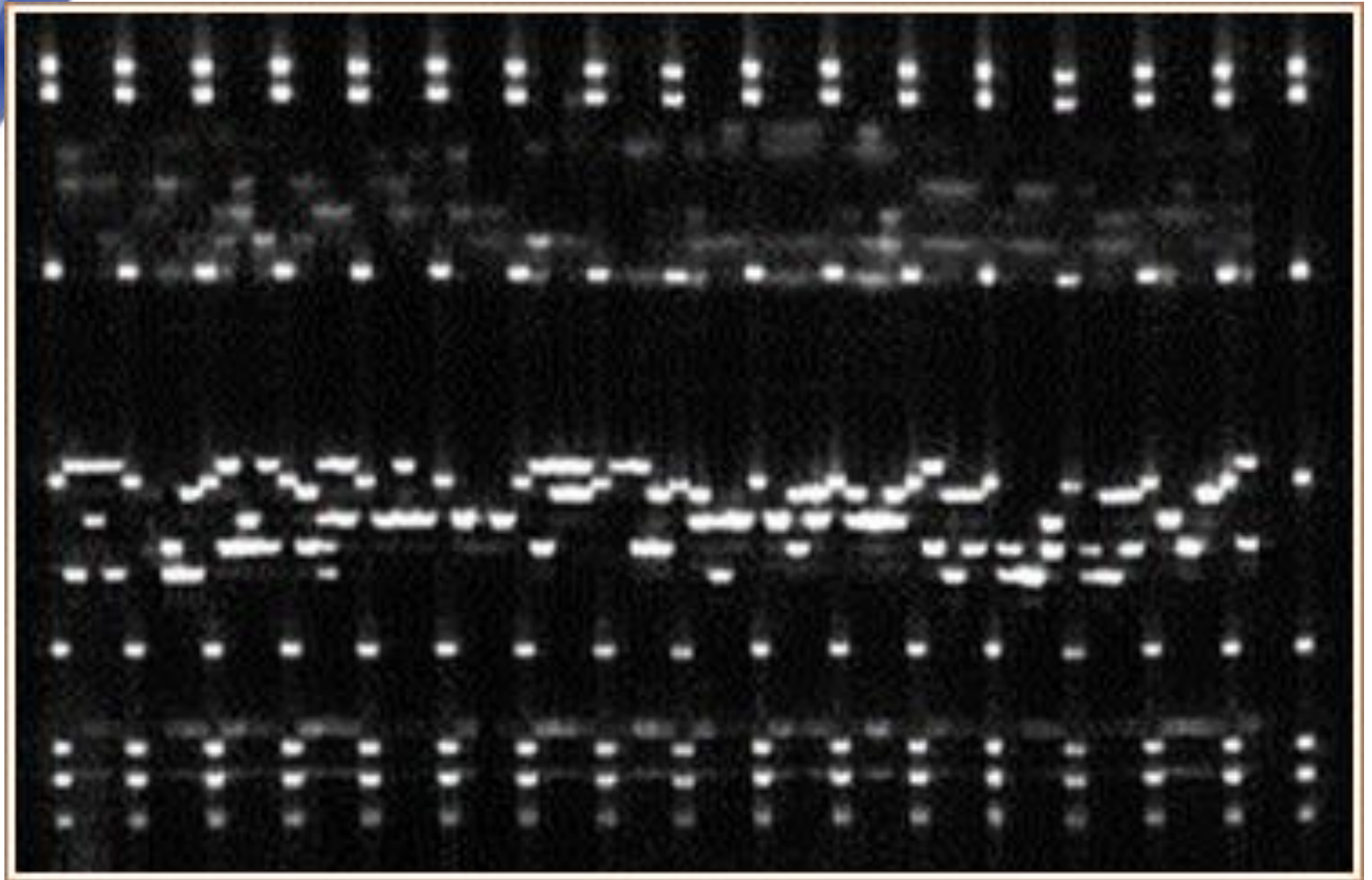


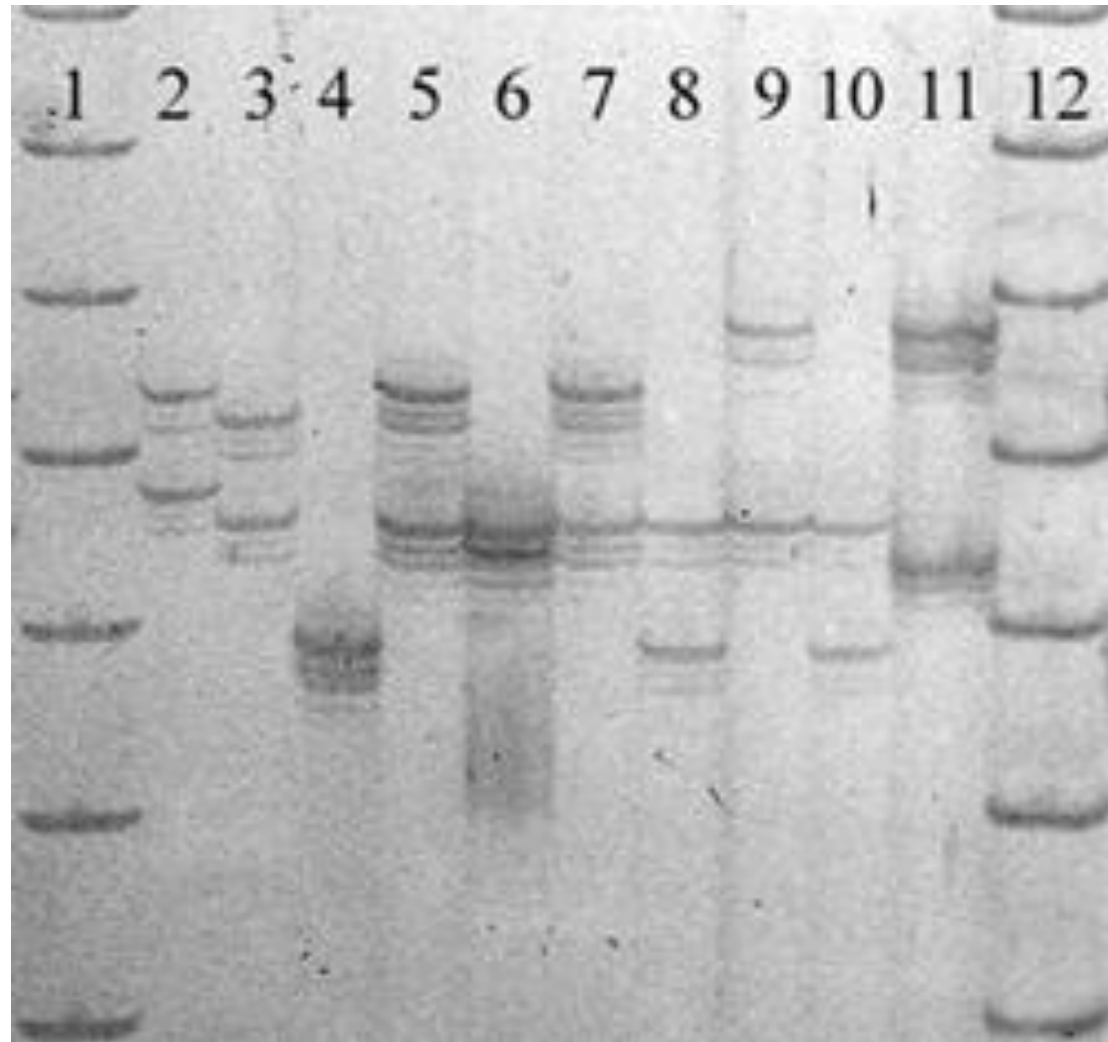
✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ **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) ATGCGGCAATTGCCATGGGTA

seq\_2 (B) ATGCGGCAATTGCCATGGG**T**

seq\_3 (B) ATGCGGCAATTGCCATGGGTA

Contig ATGCGGC**G**ATTGCCATGGGTA

SNP ↑

↑ ↑

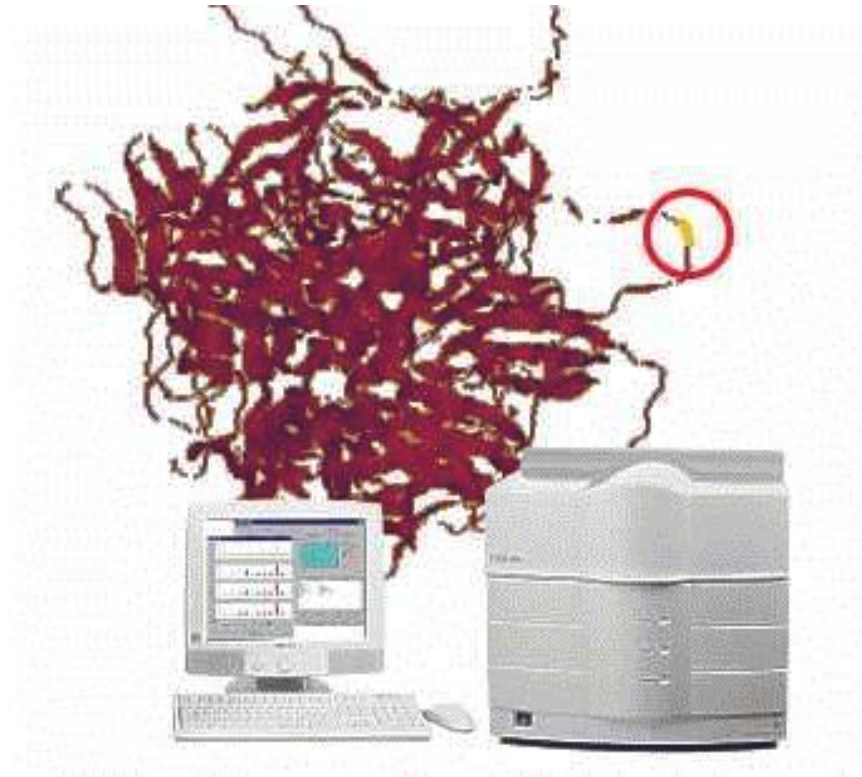
sequencing errors or paralogs

✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

✓ SNPs

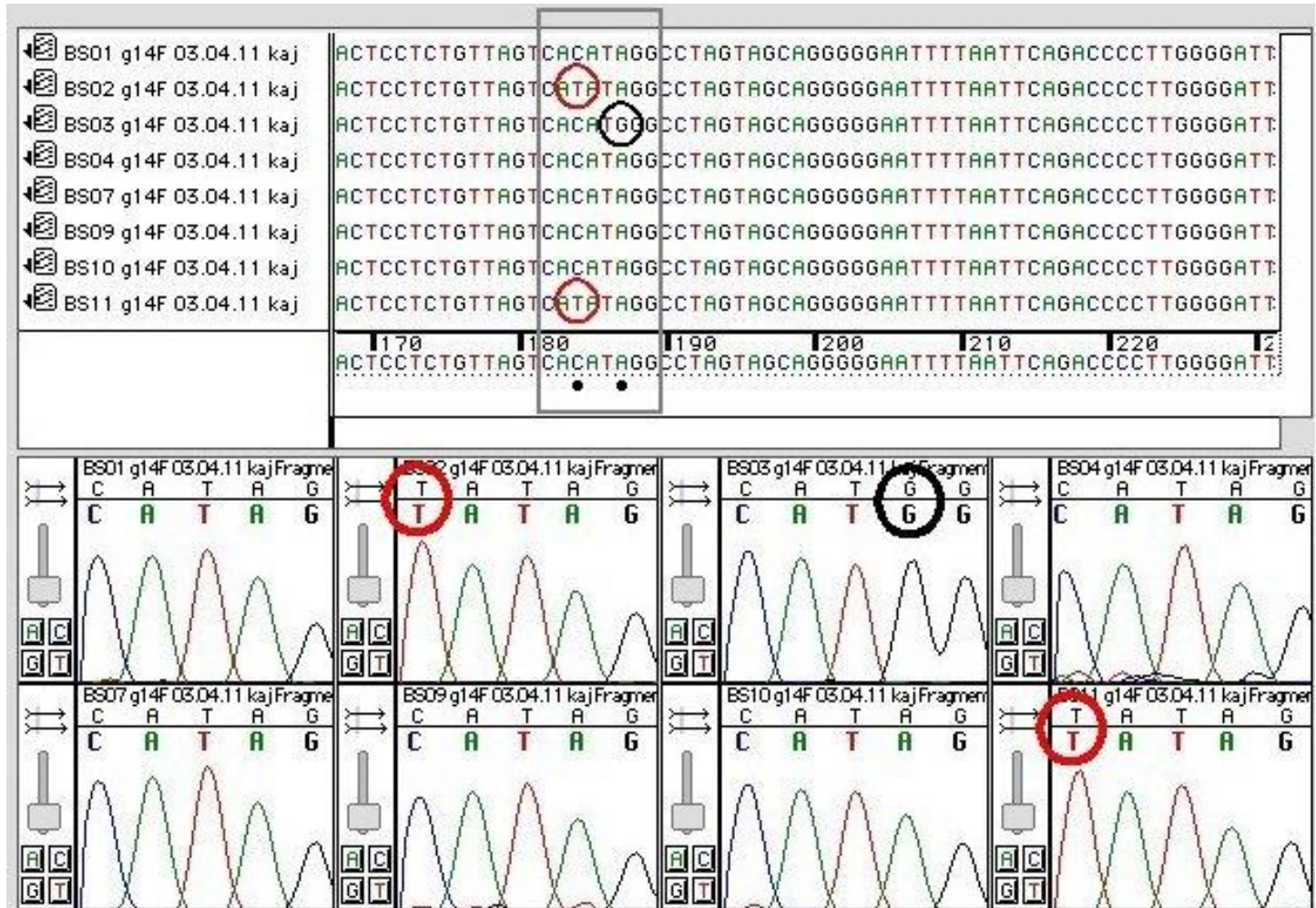
➤ *Sequenciamento*

➤ *Bioinformática*

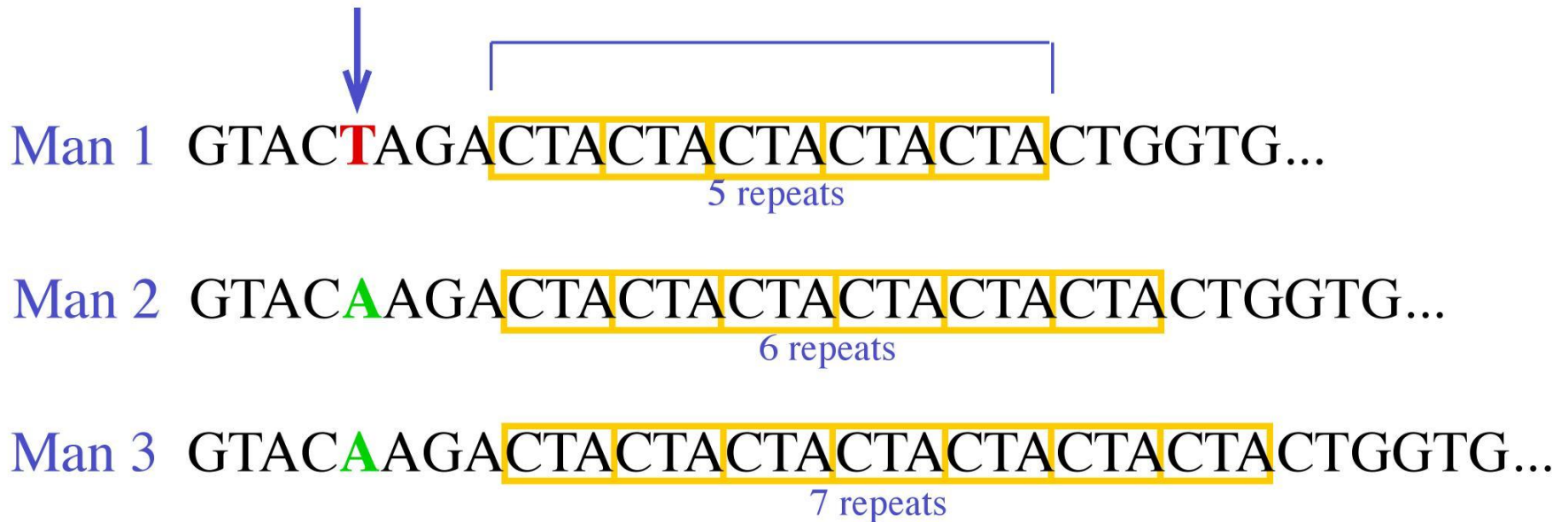


✓ Marcadores Moleculares - Amplificação

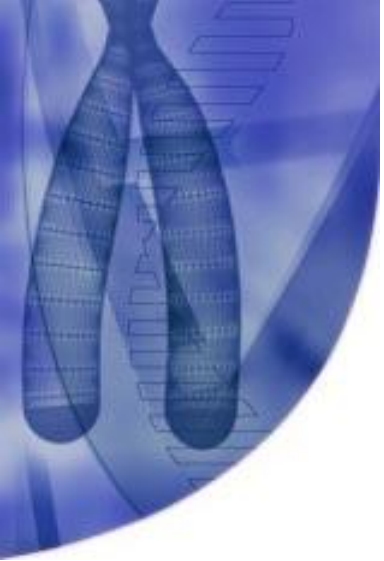
✓ SNPs



SNP      short tandem repeat (STR)



- ✓ 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**

