

Tecnologia de DNA Recombinante e técnicas de estudo da expressão gênica

- 1- Purificação de DNA/RNA
- 2- Análise de DNA
 - Eletroforese Desnatante/Não desnatante
 - Análise de restrição
 - Marcação de sondas de DNA e *Southern blot*
 - Sequenciamento
- 3- Clonagem e Manipulação de DNA
 - Ferramentas de Clonagem: enzimas e vetores
 - Produção de DNA recombinante
 - Amplificação (PCR)
 - Construção e Screening de bibliotecas: - genômica - de cDNA
 - Clonagem em *E. coli*, levedura, células animais e vegetais
 - Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes

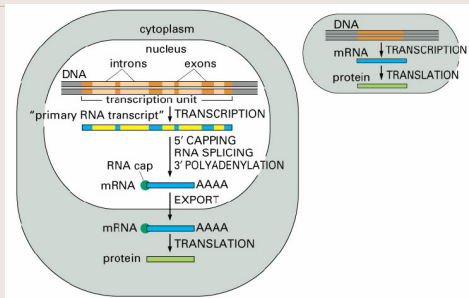
4- Estudos de expressão gênica: técnicas de análise e quantificação de RNA

Northern blot
 RT-PCR e *Real Time* RT-PCR
 Técnicas de estudo da regulação da expressão gênica
DNA footprinting
Band shift
 Transfecção com gene reporter
 Duplo-híbrido
 CHIP (*chromatin immunoprecipitation*)
 Técnicas de estudo de expressão gênica em escala genômica
DNA Microarray
 Análise de EST (*expressed sequence tags*)
 SAGE (*serial analysis of gene expression*)

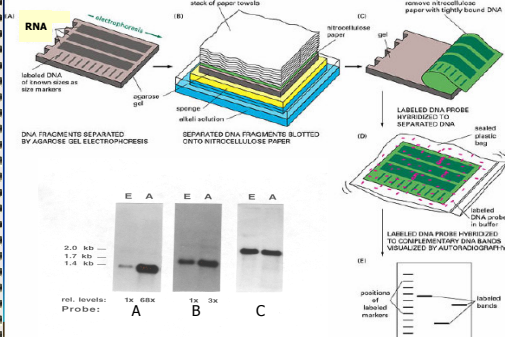
5- Estudos de genoma: técnica de sequenciamento, montagem e análises

Estudo da expressão gênica: técnicas de análise e quantificação de RNA

Etapas na expressão de genes nas células

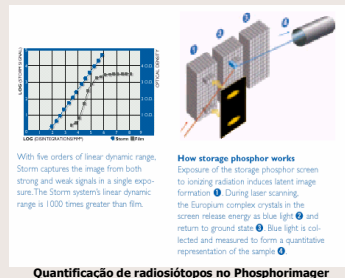


Northern Blot

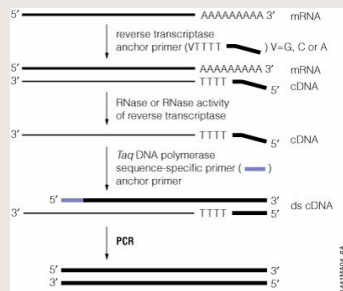


Quantificação da expressão de um mRNA

- Northern blot
- Proteção à RNase
- Primer extension
- RT-PCR (?)
- *Real Time* PCR

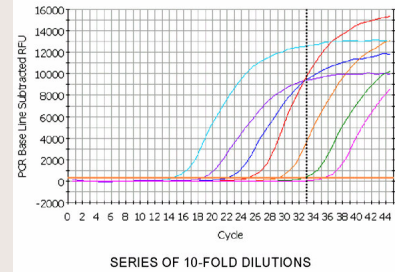


RT-PCR

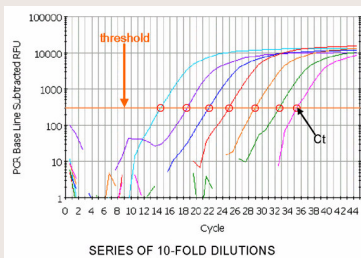


Quantificação de produtos de PCR

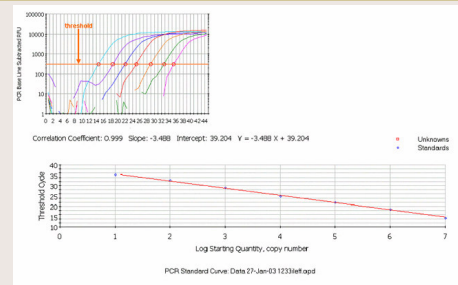
diferentes diluições de uma mesma amostra



Determinação do limiar de detecção C_t



O valor de C_t é correlacionado com a quantidade inicial de DNA amplificado



Quantificação de RNA por Real-Time PCR

Detecção de fluorescência gerada em cada ciclo de amplificação:

- SYBR green
- Primers fluorescentes



Quantificação de RNA por Real-Time PCR: o método TaqMan

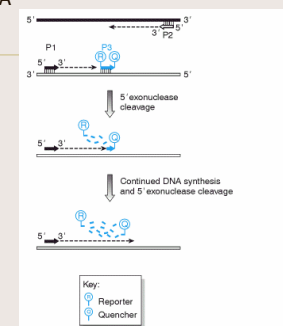
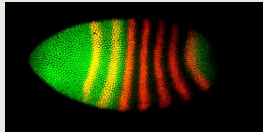


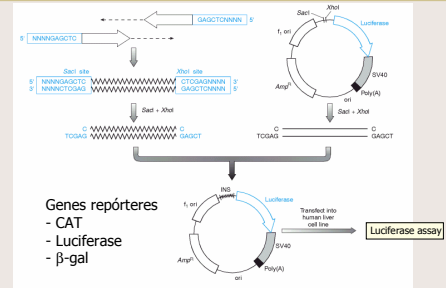
Figure 6.10. The TaqMan™ 5' exonuclease assay.

In Situ Hybridization

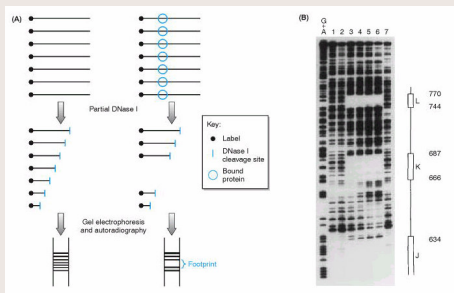
In situ hybridization of a *Drosophila* embryo with probes for *even-skipped* (red) and *hunchback* (green).



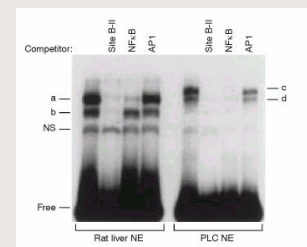
Estudo de promotores: transfecção c/ gene repórter



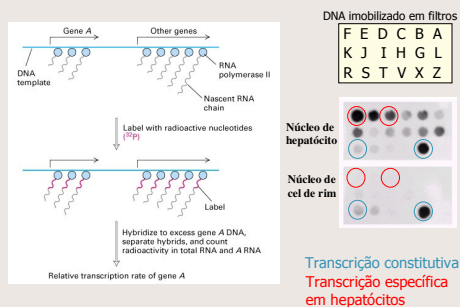
Estudo de promotores: a técnica de *DNA footprinting*



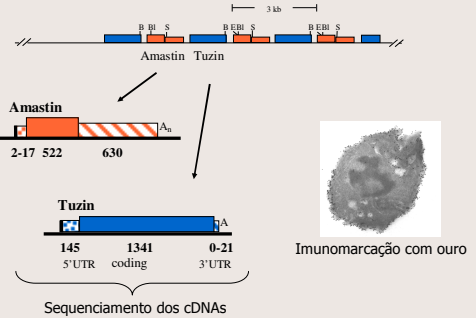
Estudo de promotores: a técnica de *band-shift*



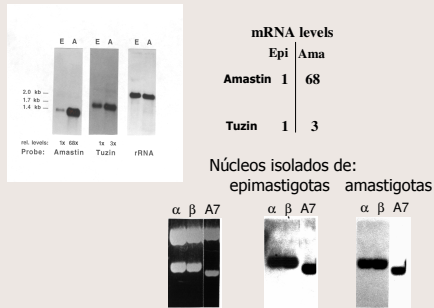
Run on



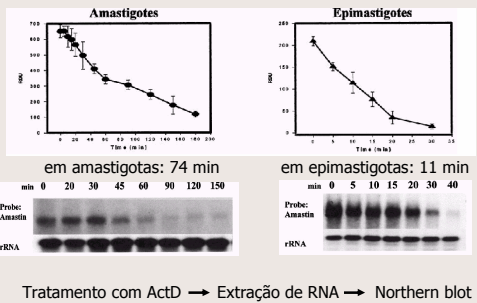
Expressão dos genes de amastina de *T. cruzi*



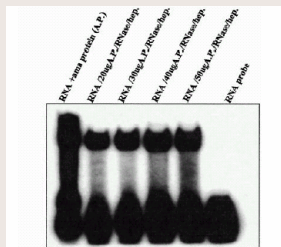
Northern blot e nuclear *run on* indicam regulação pós-transcricional



Determinação da vida média de mRNAs de amastina



Ligação de proteína à 3' UTR do mRNA de amastina



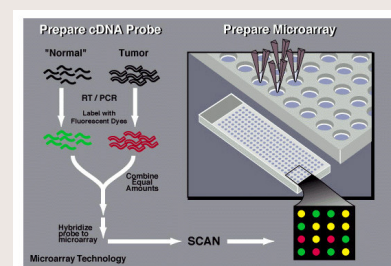
Estudos de expressão de mRNA em escala genômica: *High throughput analysis*

- ESTs
- SAGE
- Microarrays
 - cDNAs
 - Oligos
 - Gene chips (Affymetrix)

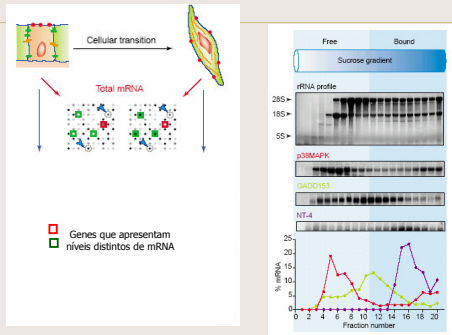
Análises de EST

- *Single-pass sequencing of "random" cDNAs*
 - Somente sequências do 5' ou 3'
 - Sequências de baixa qualidade
- ESTs são cDNAs
 - Representam mRNAs
 - Correspondem a regiões transcritas do genoma
 - Uso de bibliotecas normalizadas e não-normalizadas

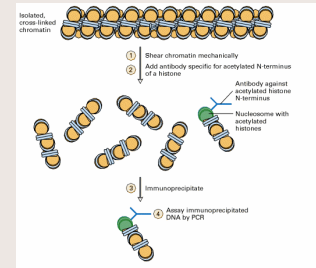
Estudos de expressão de mRNA em escala genômica: DNA Microarray



Análise de Microarray pode discriminar genes regulados pelo nível de mRNA na célula e pela taxa de tradução dos mRNAs



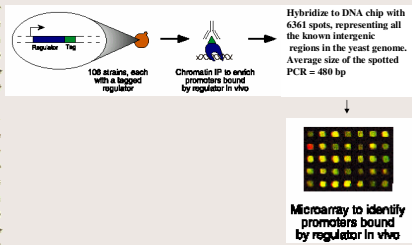
CHIP: Imunoprecipitação da cromatina



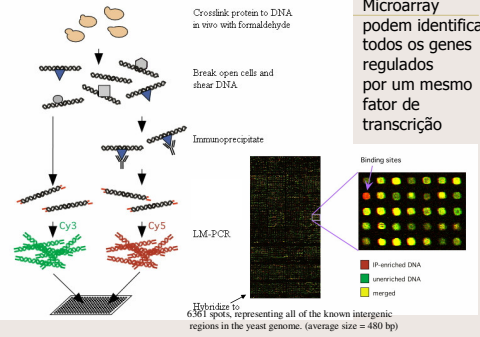
Yeast genome/proteome database:
12Mb ~6000 genes
(50% with assigned function)

Transcriptional Regulatory
Networks in *Saccharomyces
cerevisiae*
SCIENCE VOL 298 25 OCTOBER 2002

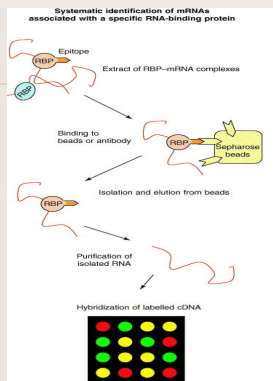
10% involved in transcription
141 with their activity tested:
myc-tagging



Schematic Summary of Genome-wide Location Profiling Assay



Identificação de sequências regulatórias reconhecidas por uma RBP



Estudo da regulação da tradução

Uso de Microarray para identificação de genes associados a polissomos

