

Aula Anterior...

Conceitos Básicos:

- ✓ Ácidos Nucleicos
- ✓ Nutrigenética
- ✓ Nutrigenômica
- ✓ Epigenética...



Genômica Nutricional



MÉTODOS DE ANÁLISE EM GENÔMICA NUTRICIONAL



Coleta de Dados

✓ Esquematizando a coleta

- ❖ Comitê de ética em Pesquisa/Bio Banco – guarda material biológico
- ❖ Pacientes/Animais
- ❖ Contato prévio com participantes (Instruções)
- ❖ Materiais para coleta (comprar?/Verba?)
- ❖ Contato com demais pesquisadores/auxiliares
 - ❖ Quem vai coletar?
 - ❖ Onde armazenar?
 - ❖ Local específico?/ Reservar?



Questionário

Amostra: _____

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Prontuário: _____

Data de Nascimento e Idade: _____ Sexo _____ Naturalidade: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Bairro _____ Cidade: _____ CEP: _____

2. HISTÓRICO MÉDICO

() Aneurisma (✓) Hipertensão () Etilismo () Dislipidemia (colesterol) () Doença Renal

(✓) Tagabismo () Diabete mellito () Transplante () Doença hepática (cirrose) () Fibromialgia

(✓) Doenças Cardiovasculares () Doenças Psiquiátricas () Neurodegenerativa Qual? _____

Obesidade Grau: _____

Atividade Física: _____ Duração: _____ qtos dias na semana: _____

Outras doenças: _____

Medicamentos em Uso: _____

Exame Físico Geral

Peso: _____ kg. Altura: _____ m. IMC (peso/altura): _____ PAS: _____ PAD: _____

Perfil Bioquímico: CT: _____ HDLc: _____ LDLc: _____ VLDLc: _____ TG: _____ Glicemia: _____

3. HISTÓRIA FAMILIAR

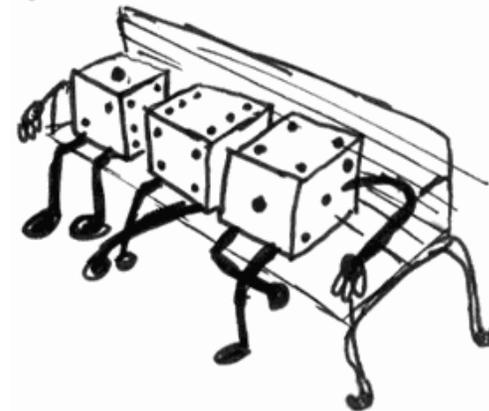
Apresenta familiar em 1º grau (pais, irmãos, filhos) com doenças relacionados a este estudo

Outros tipos de doenças: _____

Pesquisador responsável pela entrevista: _____

Data: _____

O BANCO DE DADOS

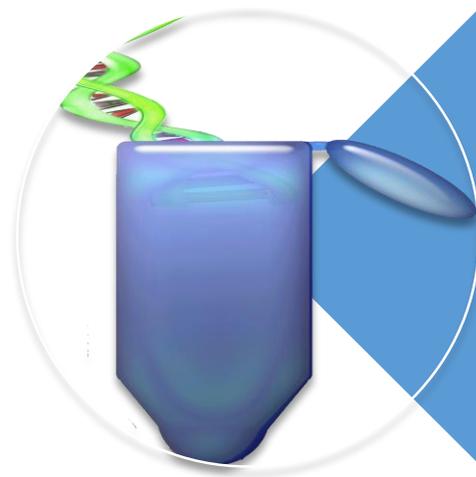




EPI!

- ✓ Armazenagem? (gelo, nitrogênio, T° ambiente)
- ✓ Qual material de coleta? (Quais tubos, Frascos)
- ✓ Quantidade aceitável (biópsia, quantos tubos)
- ✓ Quanto mais fresco melhor!





Extração de DNA

1. Extração de DNA

De onde podemos extrair DNA?

- Sangue
- Tecidos
- Cultura de Células
- Purificação de DNA de gel
- Parafina
- ...



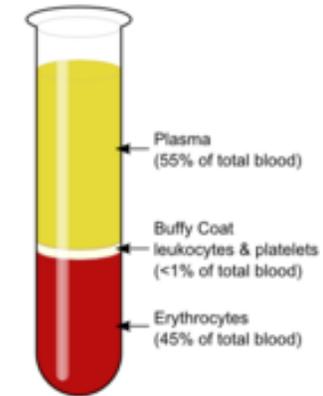
1. Extração de DNA

Material de pacientes e controles

Sangue total



Buffy coat



Amostras de tecido



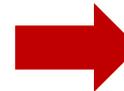
1. Extração de DNA

Aplicações

Genotipagem

Quantidade/tamanho

Sequenciamento



- **Integridade**
- **Pureza**
- **Quantidade**

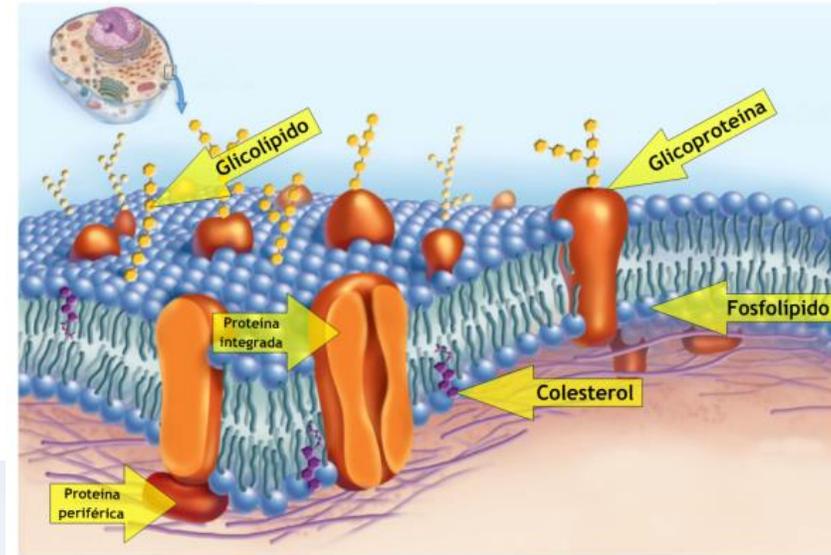
1. Extração de DNA

Etapas

1. Lise das membranas lipídicas
2. Purificação do DNA
3. Precipitação do DNA (etanol)
4. Reidratação do DNA em água ou tampão



1. Extração de DNA



1. Lise das membranas lipídicas

- Membranas: fosfolípidios + proteínas
- Rompimento da membrana celular e dos compartimentos membranosos (organelas)
- Provocada por uma solução detergente

1. Extração de DNA

2) Purificação do DNA

- a) Remoção de componentes celulares como proteínas, organelas e restos celulares
- b) Proteinase K → Desnaturação das proteínas
- c) Fenol → Remove proteínas e outros contaminantes da solução aquosa
- d) Clorofórmio → ajuda a desnaturar proteínas e remover o fenol residual

1. Extração de DNA

3) Precipitação do DNA

a) DNA é solúvel em água, mas insolúvel em álcool

a) Usa-se etanol para precipitar o DNA

b) Quanto mais gelado o etanol menos solúvel o DNA vai estar

b) Retira-se o álcool para formação do *pellet*



1. Extração de DNA

4) Reidratação do DNA

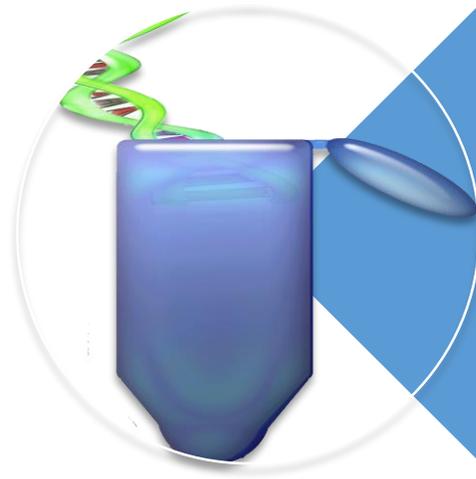
- a) Após a retirada do álcool, o DNA precisa se solubilizar em algum solvente: Água ultra-pura ou uma solução Tampão
 - a) Este solvente servirá para armazenamento do DNA extraído
 - b) Deve ser livre de contaminantes e enzimas capazes de destruir o DNA
- b) Armazenar o DNA a -20°C



1. Extração de DNA

Principais Métodos

1. Fenol/Cloróformio (**Remove proteínas/Remove excesso de Fenol**)
2. *Salting-out* (Uso de sais – CTAB, NaCl₂) (Salazar et al., 1998)
3. **Kits comerciais com colunas** (Qiagen/Promega/Genzyme) 
4. Equipamentos Automáticos



Extração de RNA

2. Extração de RNA

Aplicações: Expressão Gênica – RNA Seq

- Similar a extração de DNA
- **Protocolo bem mais cuidadoso**
- Molécula muito mais instável
- Amostra pode ser bem conservada em TRIzol™, RNAlater™
- É preciso separá-la do DNA

- TRIzol™
- Kit com colunas

#FicaDica

- Sempre utilizar materiais DNA/RNA/DNase/RNase-free;
- Manuseie TODOS os reagentes com luvas adequadas (tamanho e tipo);
- Cuidado ao retirar e reaproveitar as luvas;
- Manter as amostras sempre no gelo picado (ou câmara fria) e as enzimas no *cooler*;
- Mantenha os cabelos amarrados e não use anéis;
- Organize bem a bancada e não manuseie outros objetos enquanto estiver usando luvas.

Quantificação (avaliação) de ácidos nucleicos

Espectrofotômetro (Absorbância UV)

- Simples (amplamente utilizado)
- Quantificação e pureza



(Nanodrop)

Fluorimetria

- Corante específico
- Maior precisão e sensibilidade



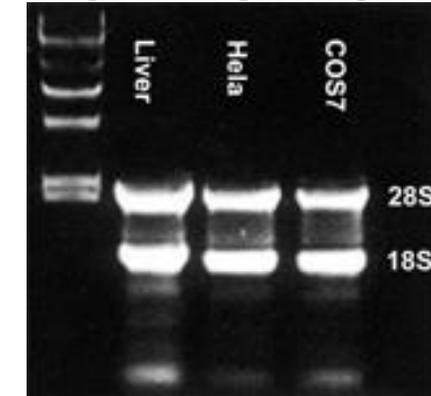
(Qubit)

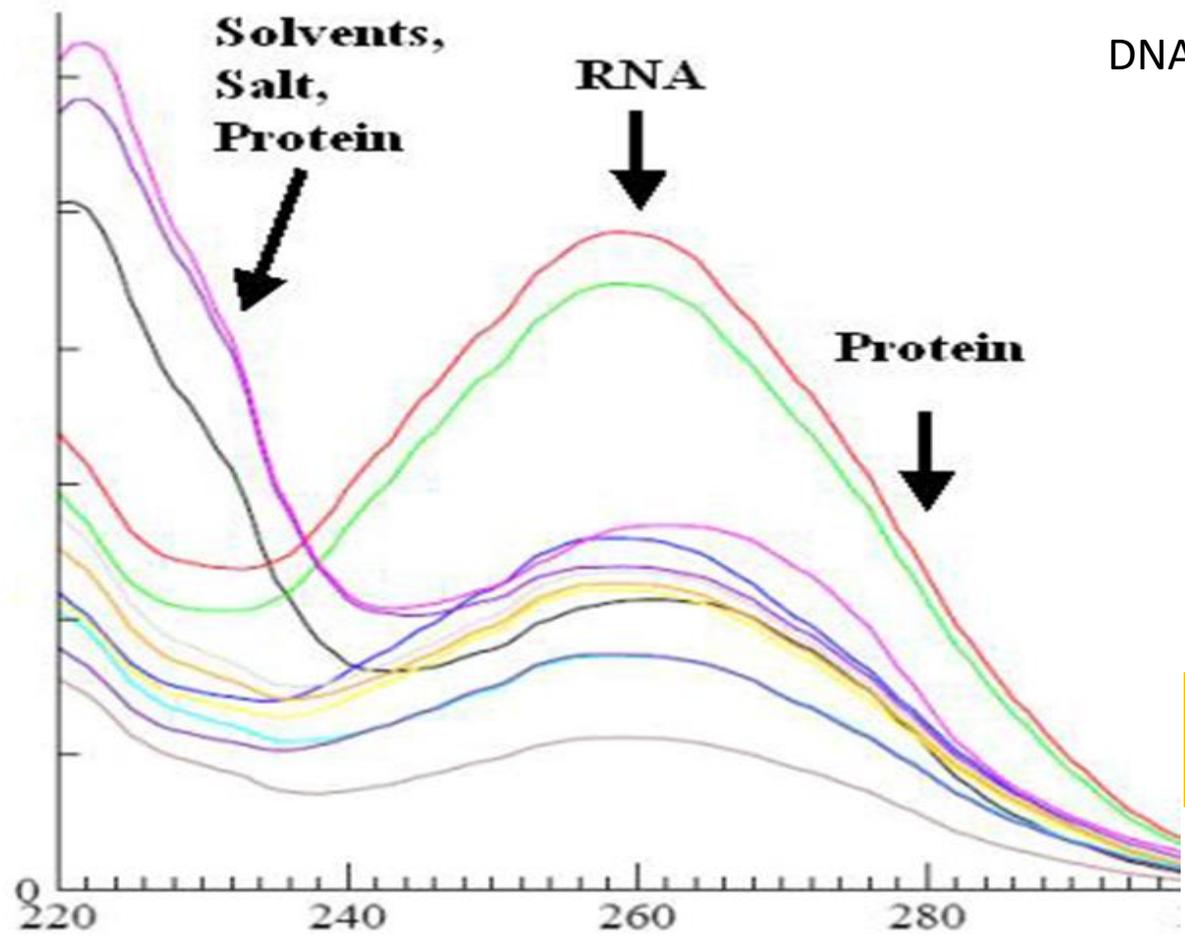
Bioanalyzer

- Maior precisão
- Quantificação e pureza
- Integridade



Integridade – gel de agarose





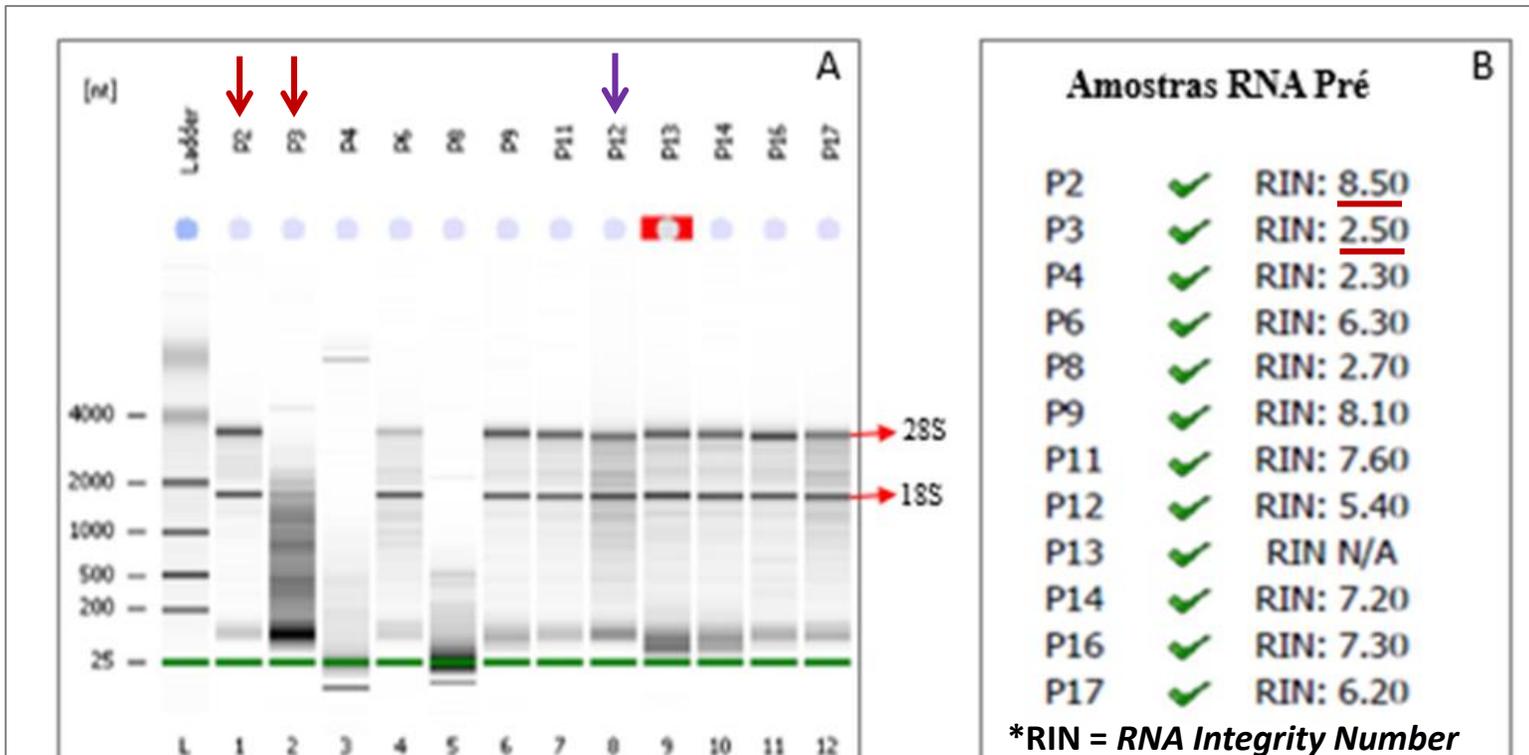
DNA e RNA → comp. ~: 260nm

Valores discrepantes indicam contaminação com fenol ou proteínas.

260/230 ~1,8
260/280 ~2,0

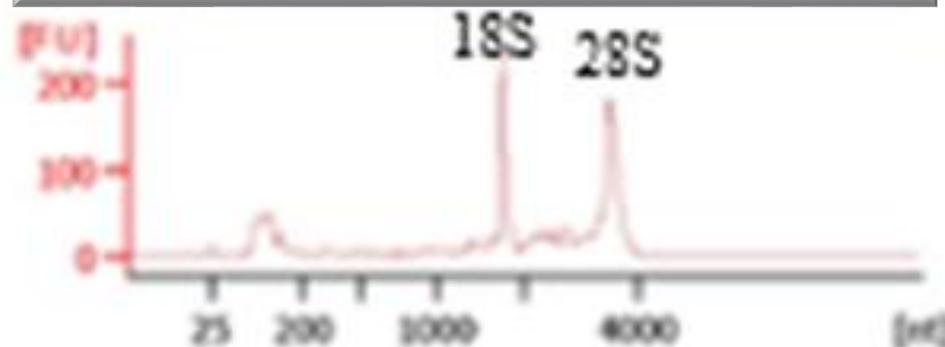
260nm – DNA/RNA
280nm – proteína, fenol,..
230nm – contaminantes (carboidratos, fenol...)

Bioanalyzer



RIN = 8,50

RNA Integrity Number – RIN >7



Armazenar

DNA: -20°C

Estoque

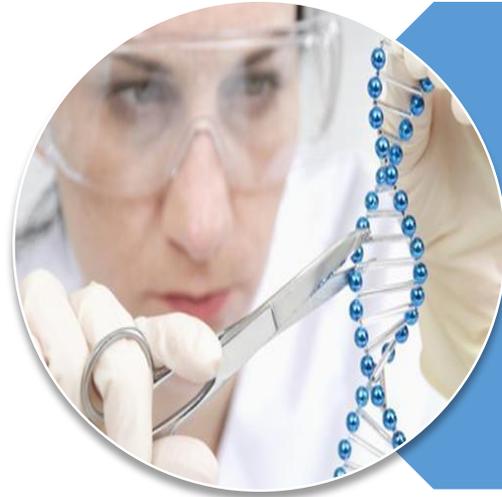
Uso (diluído)

RNA: -80°C



Se depois de todo esse trabalho, seus ácidos nucleicos **NÃO** apresentarem qualidade... É preciso descobrir onde está o erro...





Fundamentos da Reação em Cadeia da Polimerase

Quais são as aplicações da PCR?

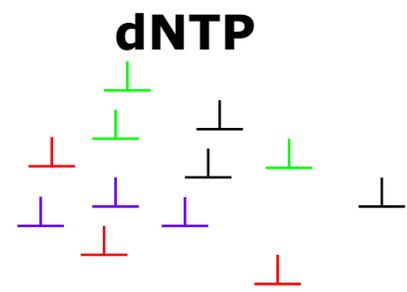
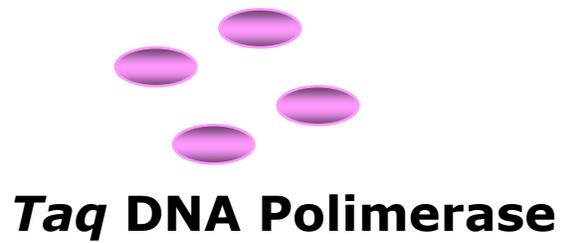
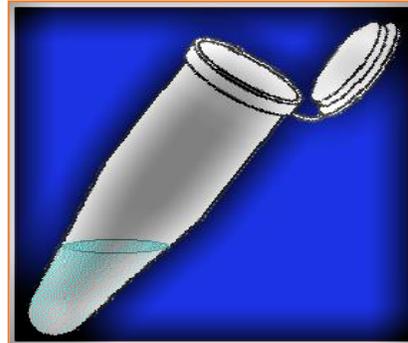
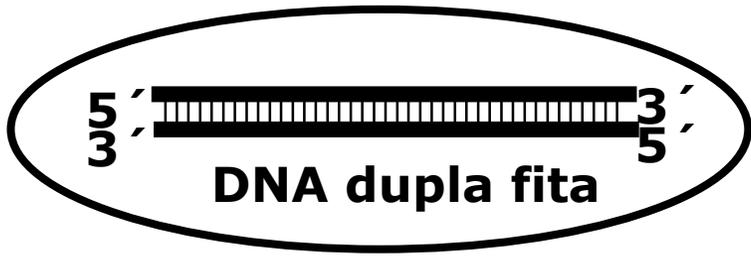
- ❖ Diagnósticos moleculares (área oncológica)
 - *(Carga viral, tipagem de transplante, paternidade, investigações criminais)*
- ❖ Análise de expressão gênica (Quantidade de material biológico)
- ❖ Confecção de cDNA (a partir de RNAm)
- ❖ Análise de mutações
- ❖ Discriminação alélica (Genotipagem dos polimorfismos)
- ❖ Metilação
- ❖ Comprimento telômeros

Fundamentos da PCR

- ❖ ***Polymerase Chain Reaction*** (reação em cadeia da polimerase), técnica na qual milhões de cópias de **sequências alvo** são amplificadas, a partir de pequenas quantidades de **DNA** ou **RNA**, por meio de uma **reação enzimática termodinâmica**.
- ❖ → Desenvolvida em 1985 por Kary Mullis.
- ❖ → Processo termodinâmico *in vitro*.
- ❖ → Taq DNA Polimerase (Bactéria termal – *thermus aquaticus*)

Reagentes

Primers/Sondas



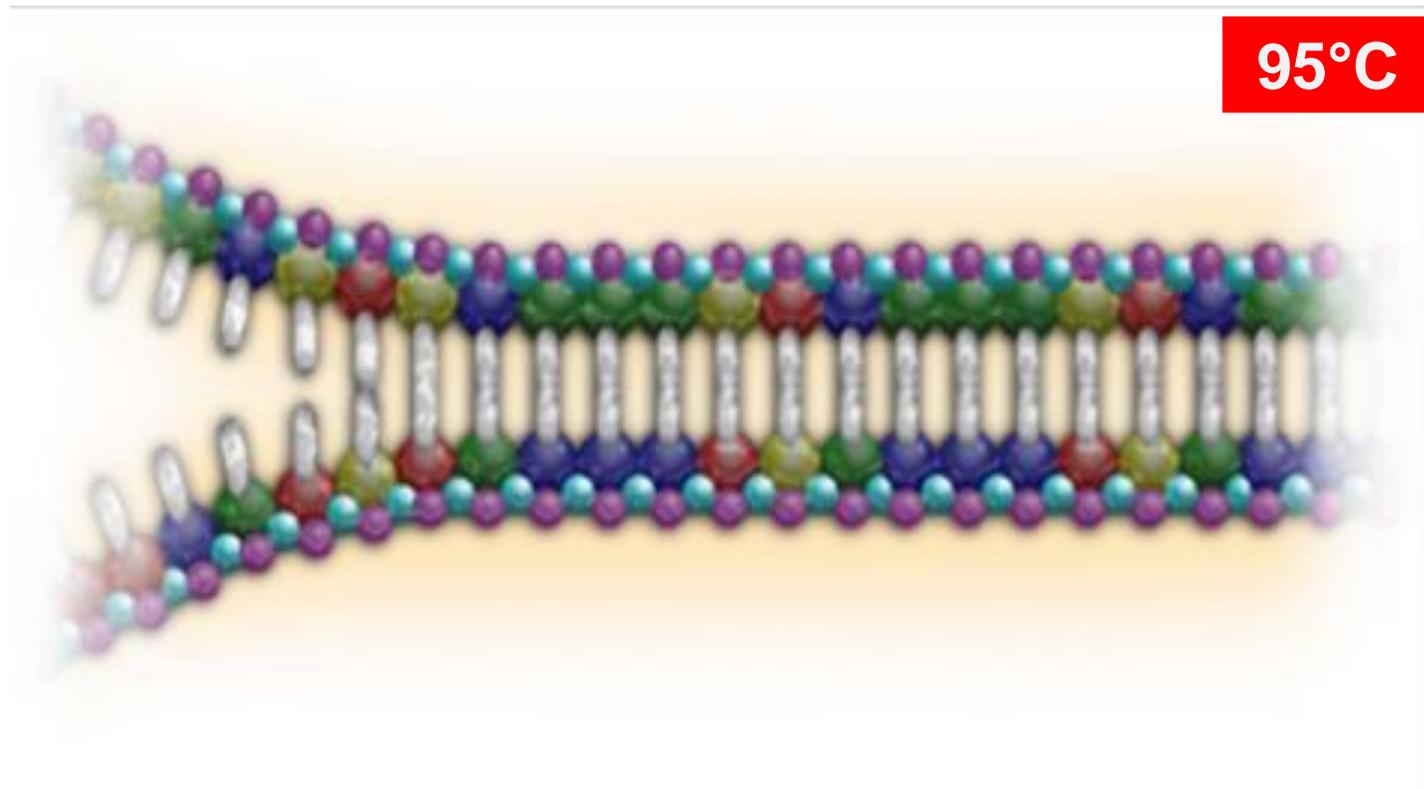
Equipamentos utilizados

- ✓ **Termociclador** (Automatizado e computadorizado);
- ✓ Promove a alternância de temperaturas por determinados períodos;
- ✓ Ciclos repetitivos de desnaturação e síntese de novas fitas do DNA.



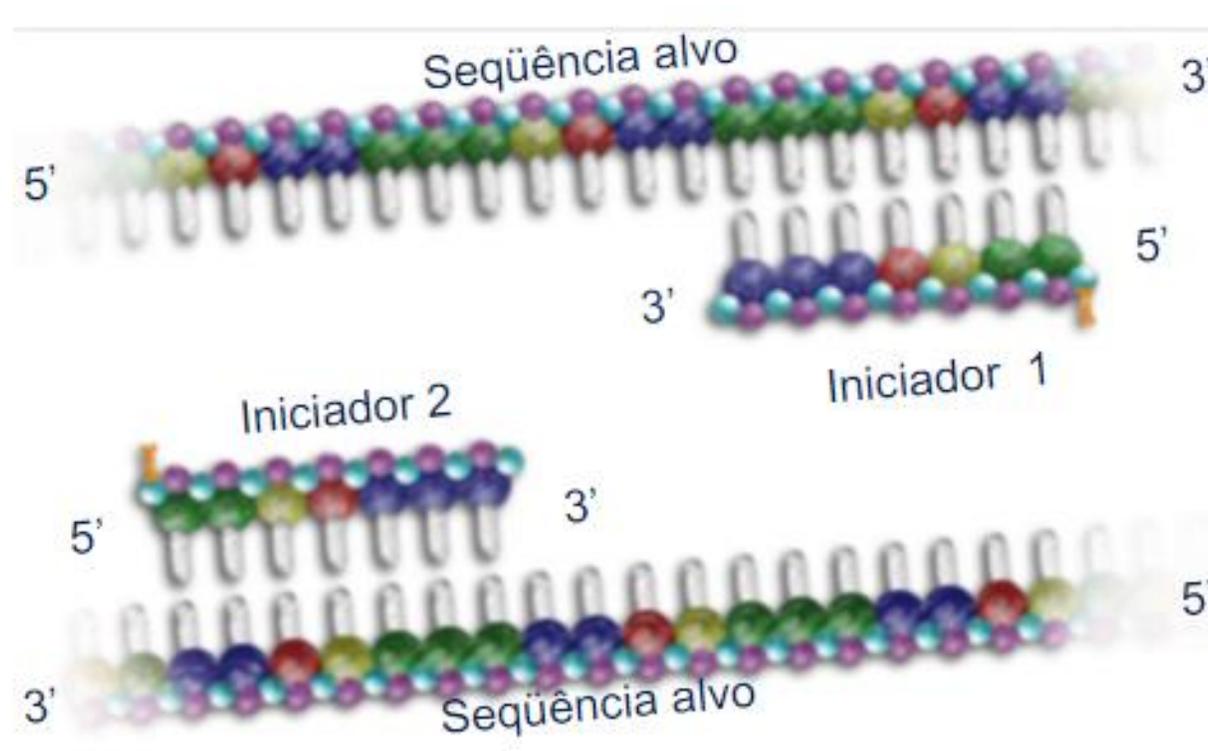
Ciclos da PCR – Etapa 1

DESNATURAÇÃO DO DNA



Ciclos da PCR – Etapa 2

Hibridização dos Iniciadores na sequencia alvo de DNA

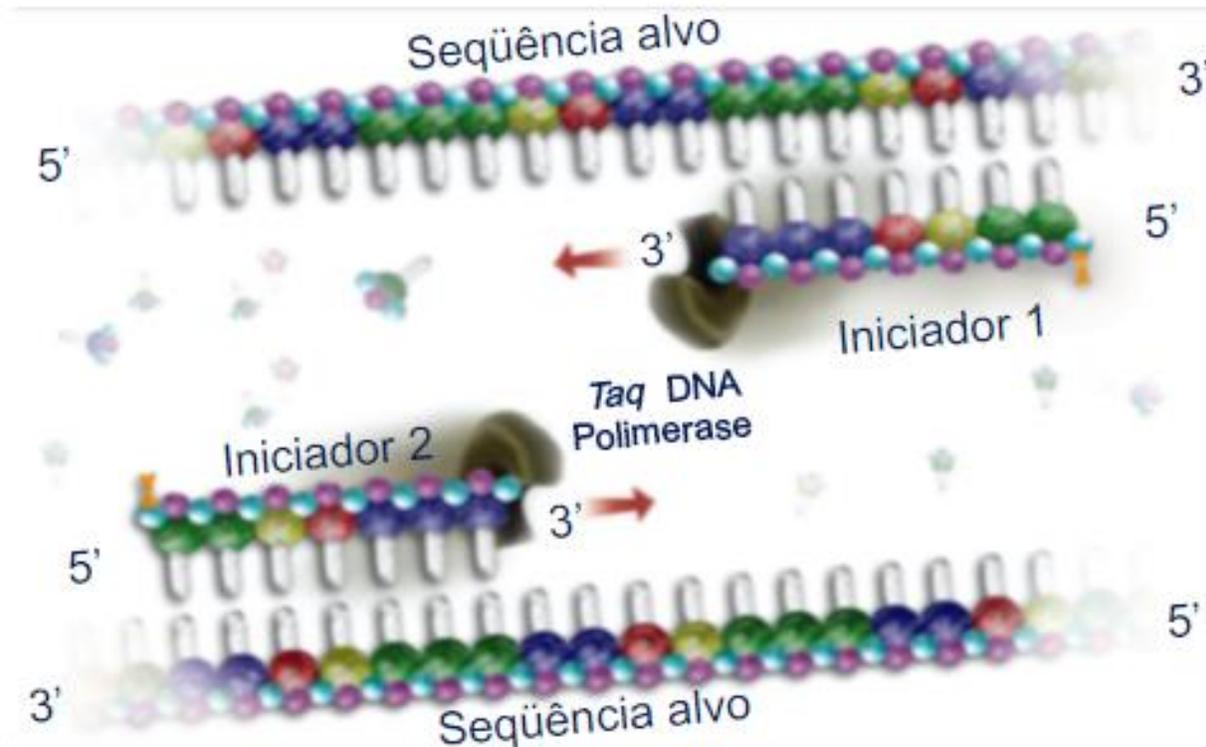


55°C



Ciclos da PCR – Etapa 3

Síntese da Cadeia Complementar pela *Taq* DNA Polimerase

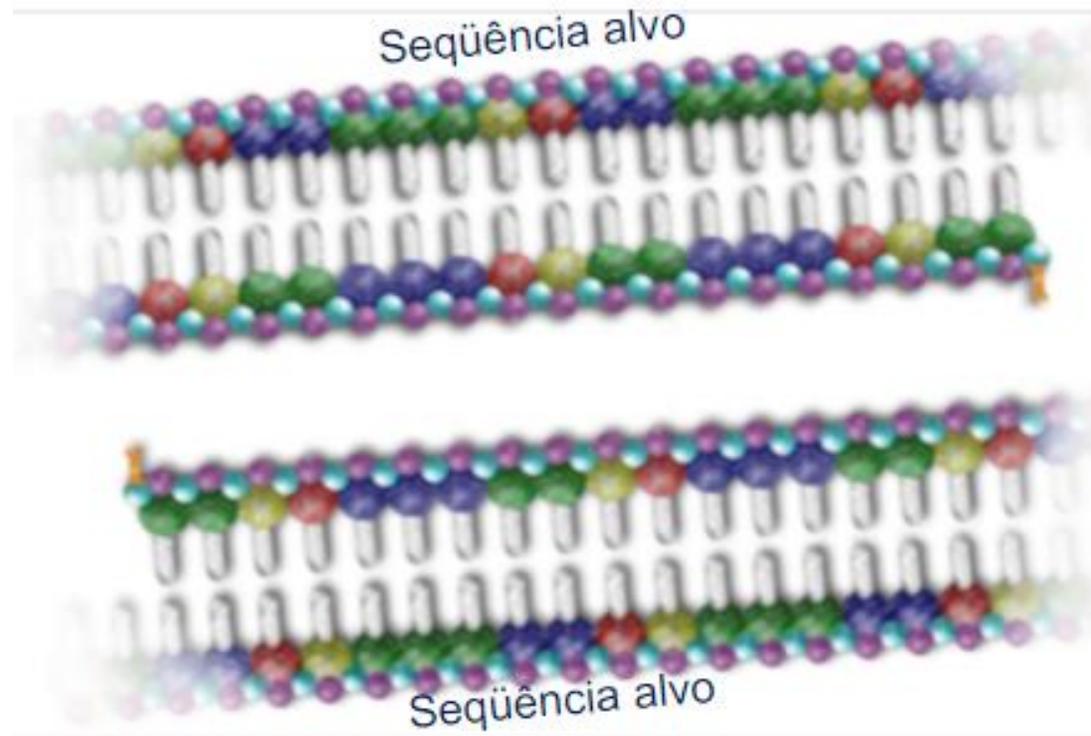


72°C

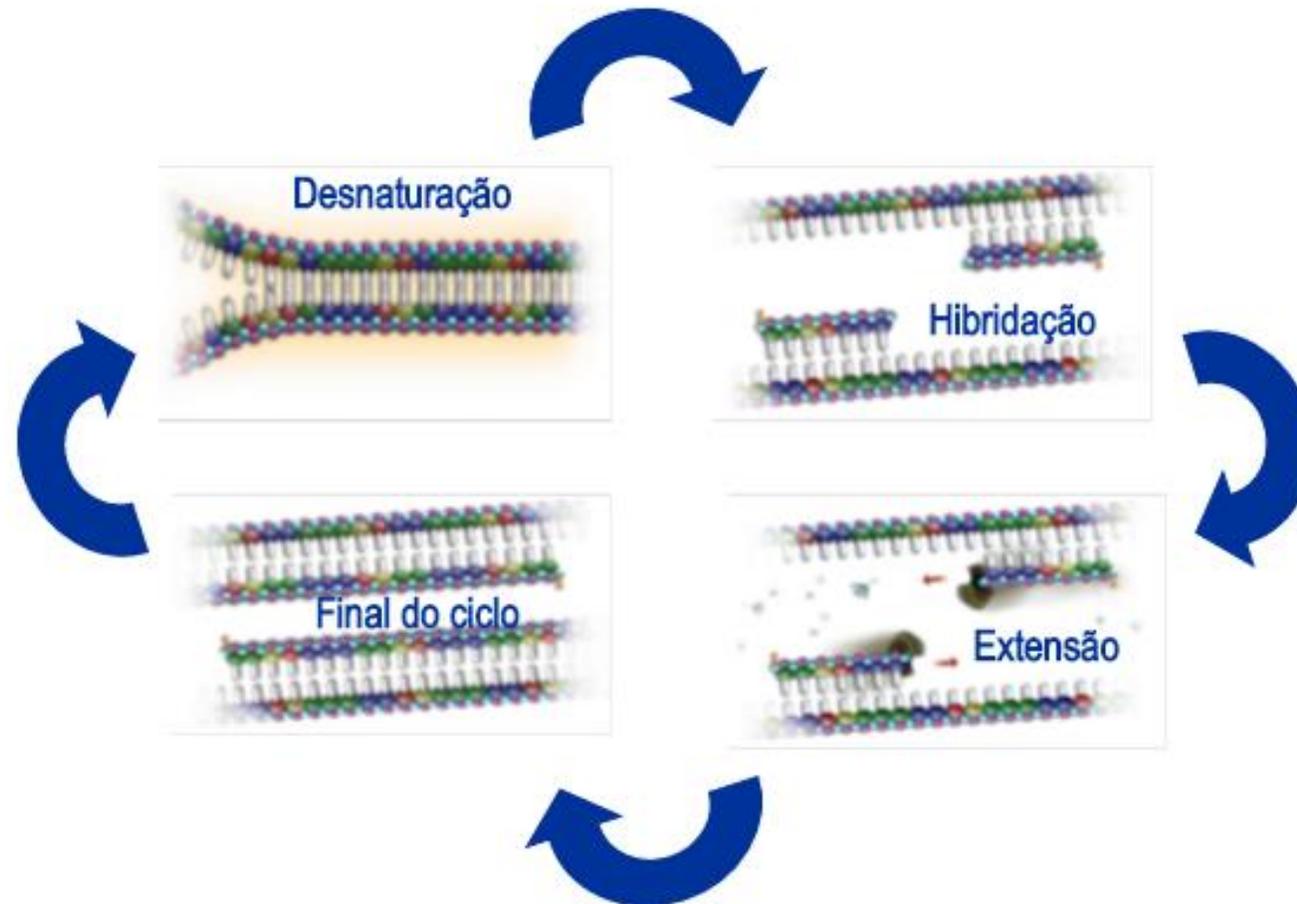


Final do 1º Ciclo

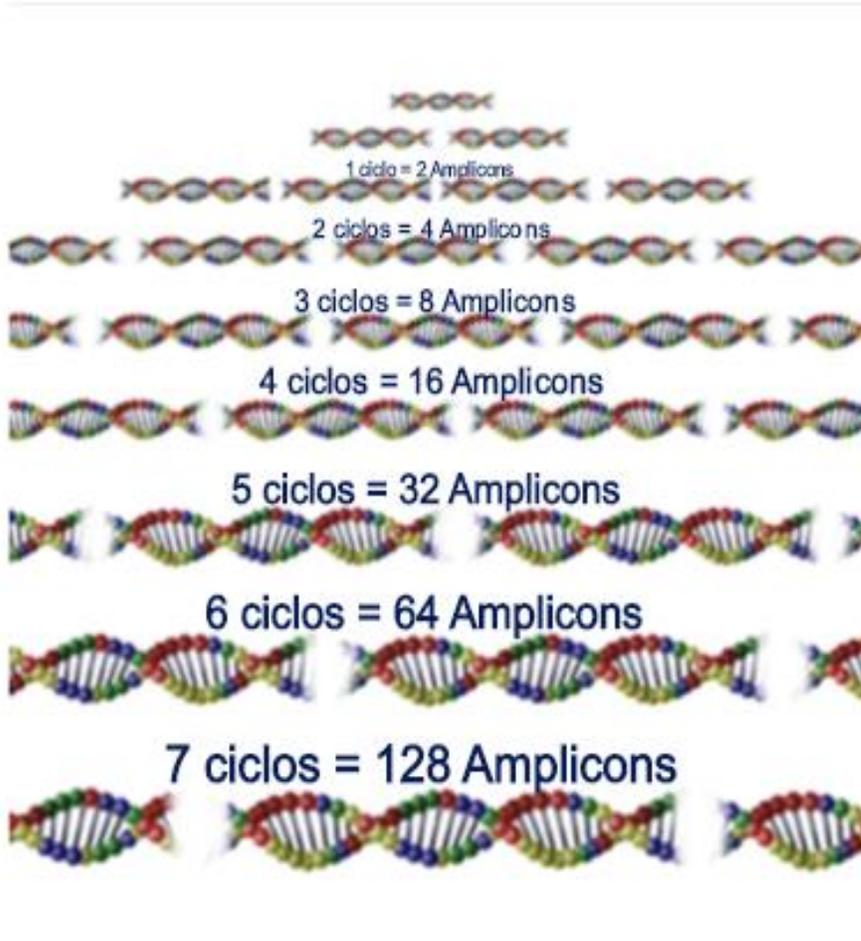
2 cópias da sequência alvo



Ciclos da PCR (36 a 40 ciclos)



Produto da PCR



No. Ciclos	No. Amplicons Copias do DNA alvo
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1.048.576
30	1.073.741.824

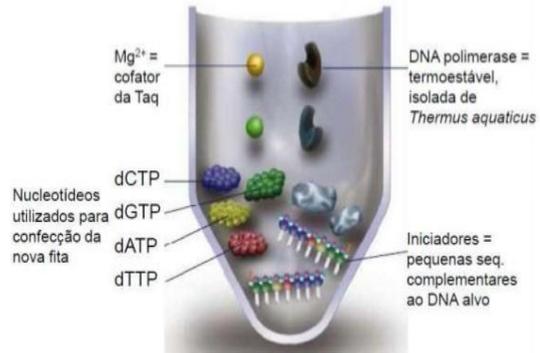
exponencial



Tipos de PCR

PCR Convencional

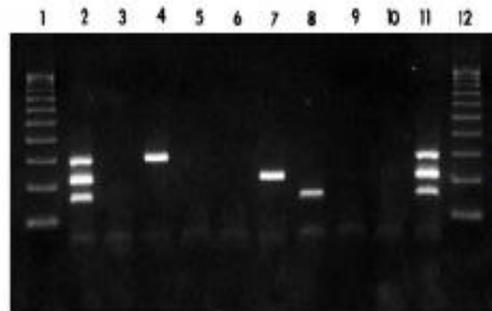
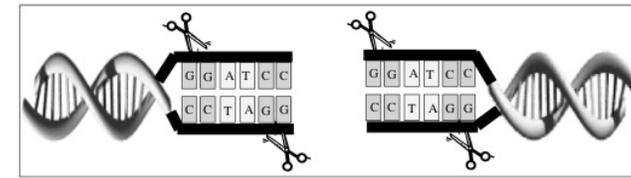
Componentes da PCR



Tampão = mantém o pH ótimo para atividade da enzima.



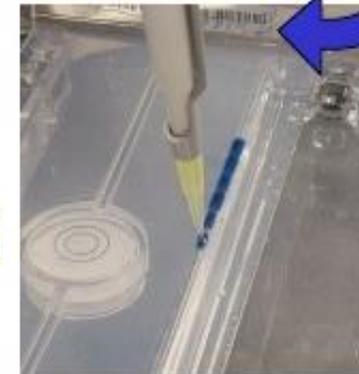
Restrição enzimática



Fotodocumentação



Detecção (Brometo de etídio)



Eletroforese
30 – 40 min

PCR EM TEMPO REAL

Monitora a fluorescência emitida durante a reação, realizando a avaliação do nº de moléculas produzidas ciclo a ciclo – **daí a denominação PCR em tempo real.**

Vantagens da PCR em Tempo Real

- ❖ Facilidade de quantificação;
- ❖ Maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão
- ❖ Rapidez
- ❖ Melhor controle de qualidade no processo
- ❖ Menor risco de contaminação
- ❖ Resultados Fidedignos

PCR EM TEMPO REAL

Reagentes

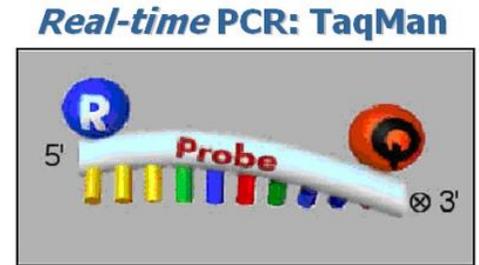
→ DNA molde, primers (sondas), nucleotídeos e enzima Taq Polimerase

Corantes Fluorescentes

❖ SYBR green[®] – Applied Biosystems

❖ TaqMAN[®] – Applied Biosystems

TaqMan (Applied Biosystems®) Expressão gênica



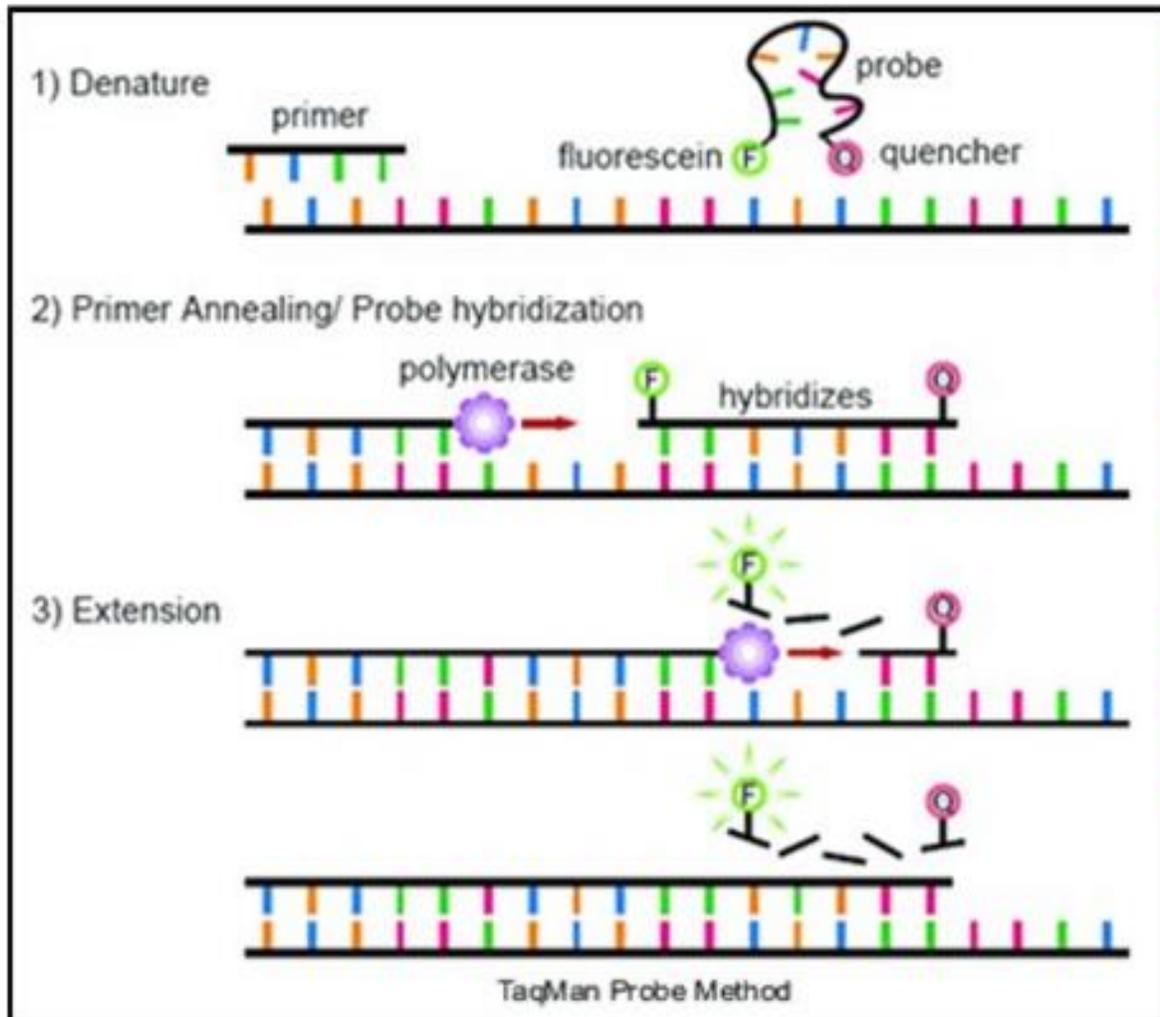
- ❖ Corante mais adequado ao uso em PCR tempo real – baseado na utilização de três produtos:
 - 2 *primers* (específicos para o gene de interesse)
 - 1 terceiro *primer* (**sonda**) que pareia internamente (entre os *primers* acima referidos).

Características da Sonda

- ❖ Contém dois compostos especiais: um fluorescente (Fluoróforo - Reporter) e outro denominado “quencher”

Método TAQMAN – expressão gênica

N de cópias e se o gene está mais ou menos expresso

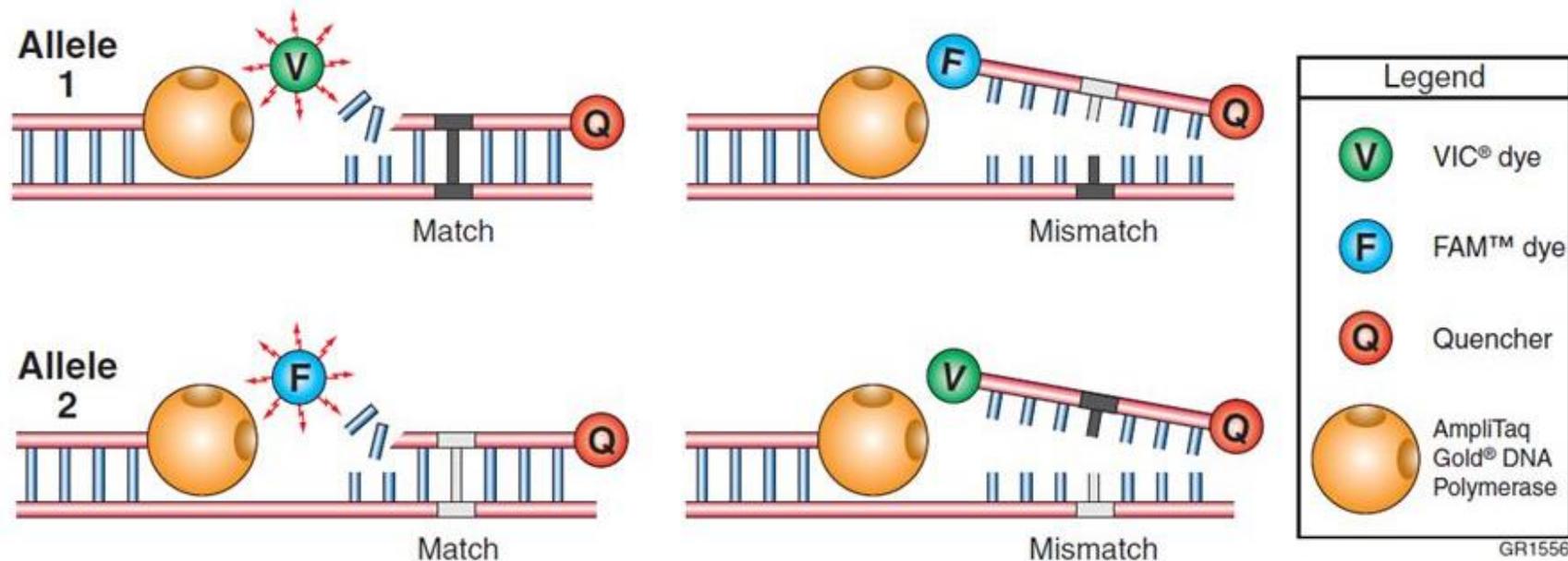


• Sonda TaqMan[®] complementar a uma região interna do produto de PCR e ligada a um composto fluorescente .

• Quando a amplificação começa , a DNA polimerase corta a sonda, e a fluorescência é liberada .

• A fluorescência é liberada a cada ciclo , gerando um sinal fluorescente específico da seqüência.

Discriminação Alélica → Genotipagem



Aumento da fluorescência em...

Somente no Corante VIC →

Somente no Corante FAM →

VIC e FAM > fluorescência →

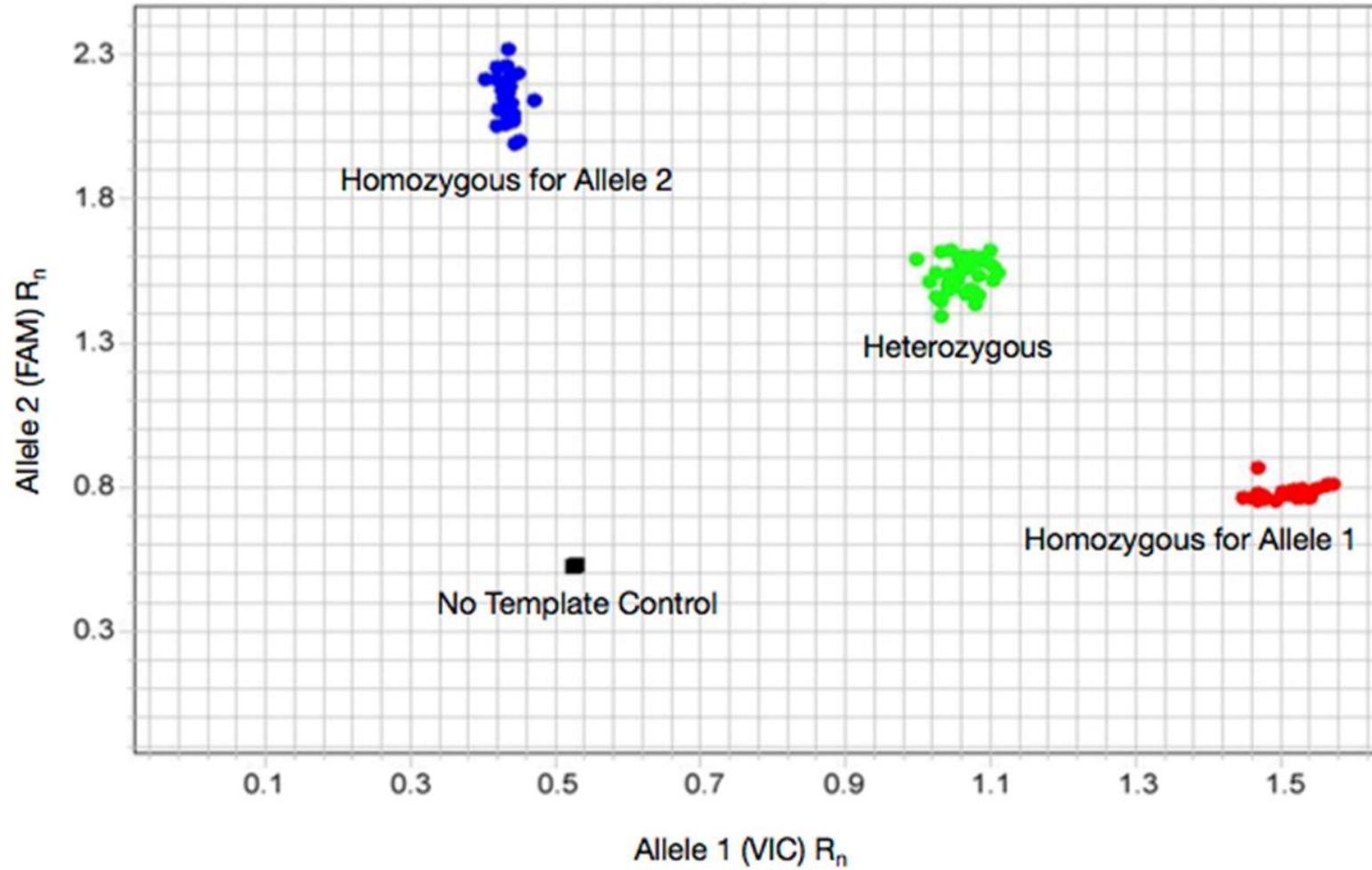
Indica que ...

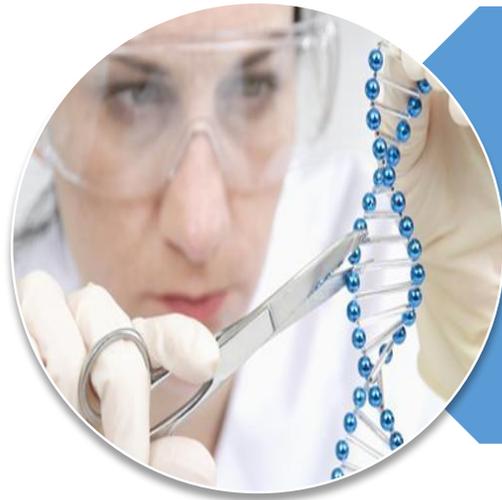
Homozigoto para Alelo 1

Homozigoto para Alelo 2

Heterozigoto

Genotyping





Expressão Gênica

The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

Stephen A. Bustin,^{1*} Vladimir Benes,² Jeremy A. Garson,^{3,4} Jan Hellemans,⁵ Jim Huggett,⁶
Mikael Kubista,^{7,8} Reinhold Mueller,⁹ Tania Nolan,¹⁰ Michael W. Pfaffl,¹¹ Gregory L. Shipley,¹²
Jo Vandesompele,⁵ and Carl T. Wittwer^{13,14}

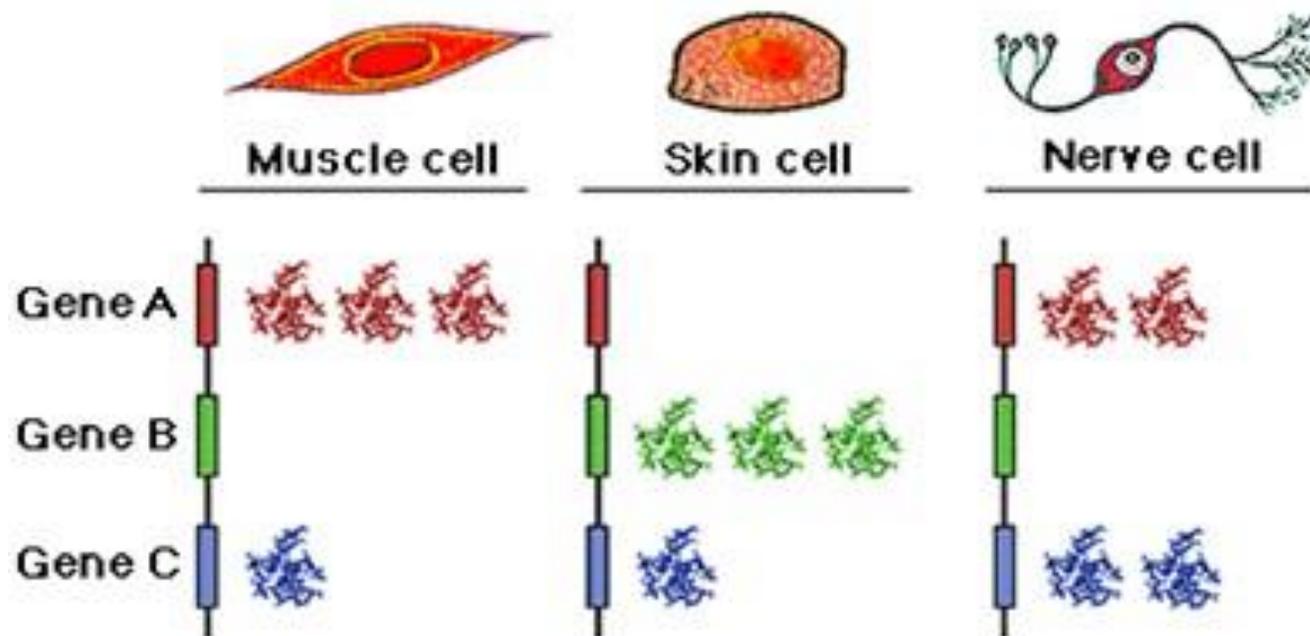
BACKGROUND: Currently, a lack of consensus exists on how best to perform and interpret quantitative real-time PCR (qPCR) experiments. The problem is exacerbated by a lack of sufficient experimental detail in many publications, which impedes a reader's ability to evaluate critically the quality of the results presented or to repeat the experiments.

SUMMARY: Following these guidelines will encourage better experimental practice, allowing more reliable and unequivocal interpretation of qPCR results.

© 2009 American Association for Clinical Chemistry

The fluorescence-based quantitative real-time PCR
[DOI: 10.1373/clinchem.2008.119511]

Expressão variável em diferentes tecidos ou diferentes fases do desenvolvimento



www.gtexportal.org

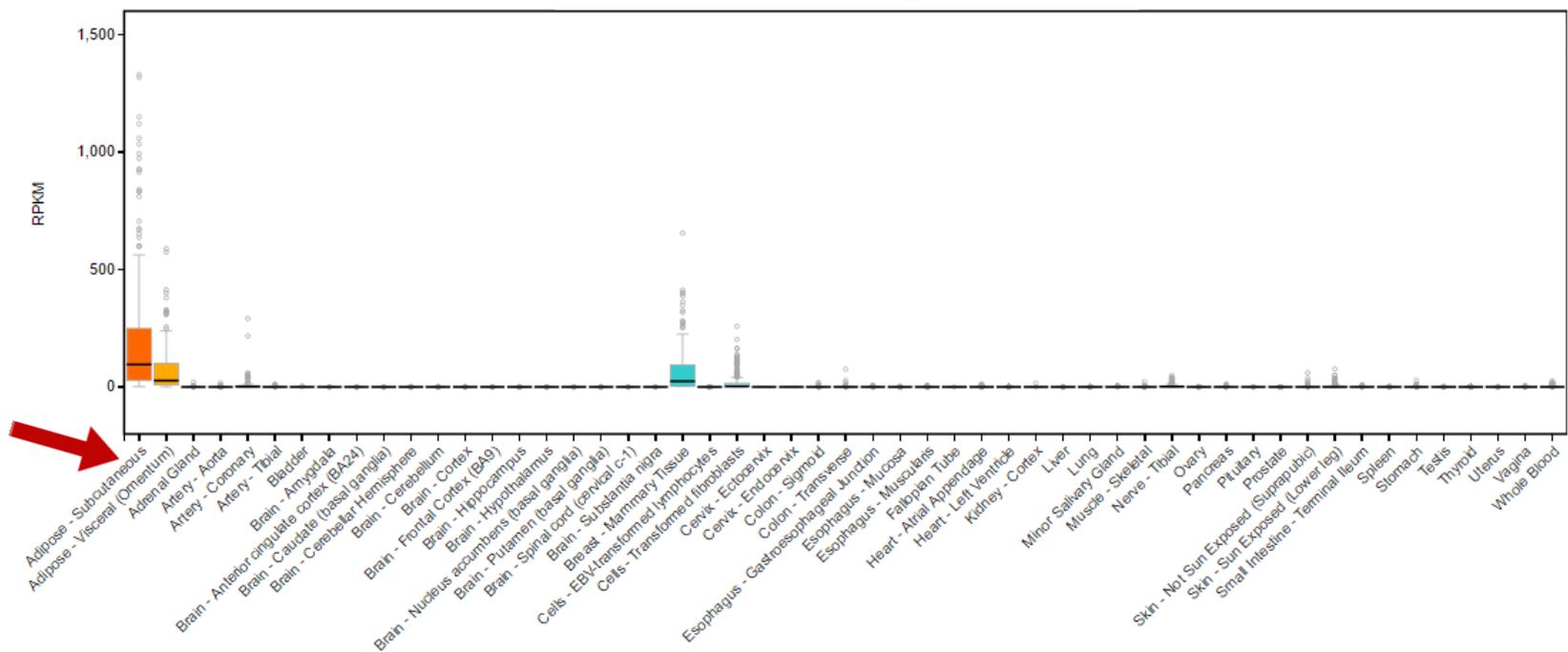
GTEX Portal

Home GTEX Datasets Gene Association eQTL Browser Sample Data Documentation Publications Contact

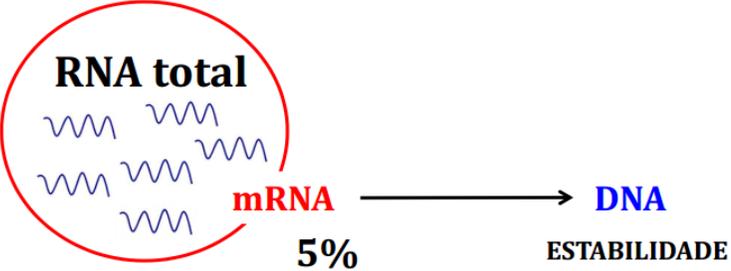
LEP Login Register

2016-8-4
New Histology Image Viewer
Read More >>

LEP Gene expression

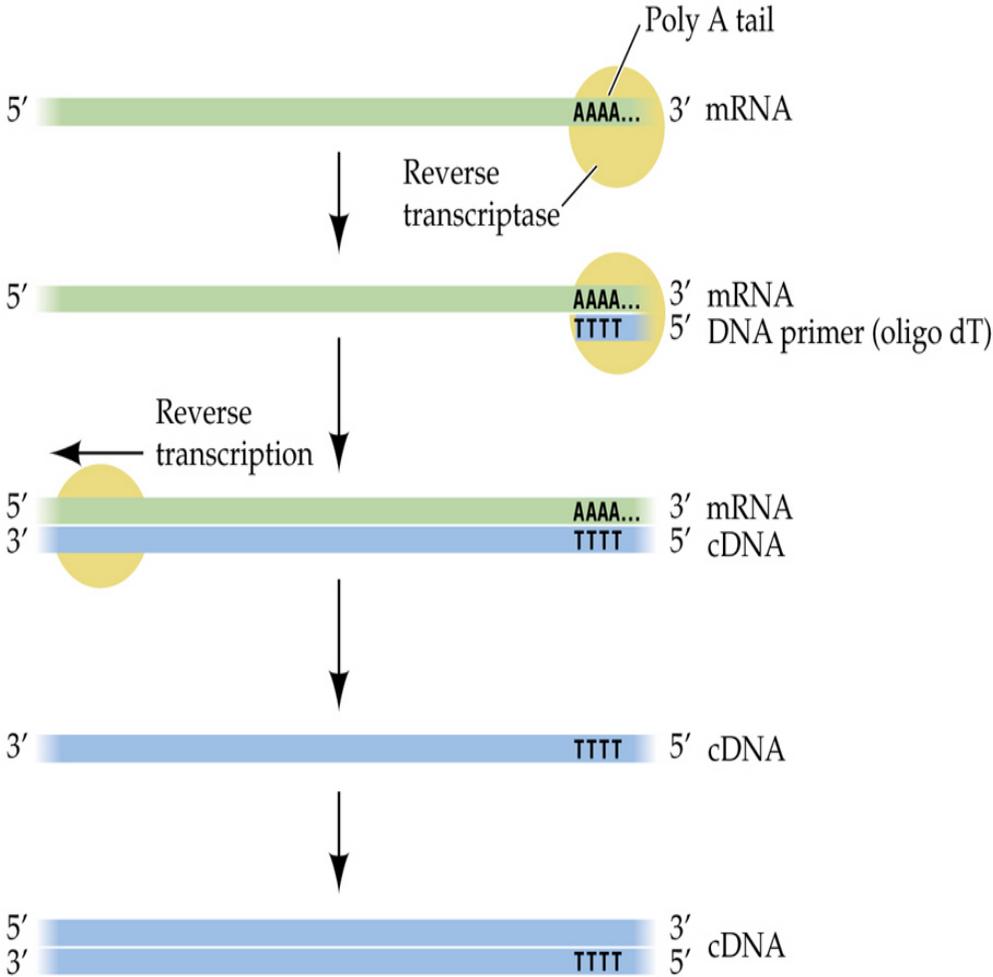


Síntese de cDNA

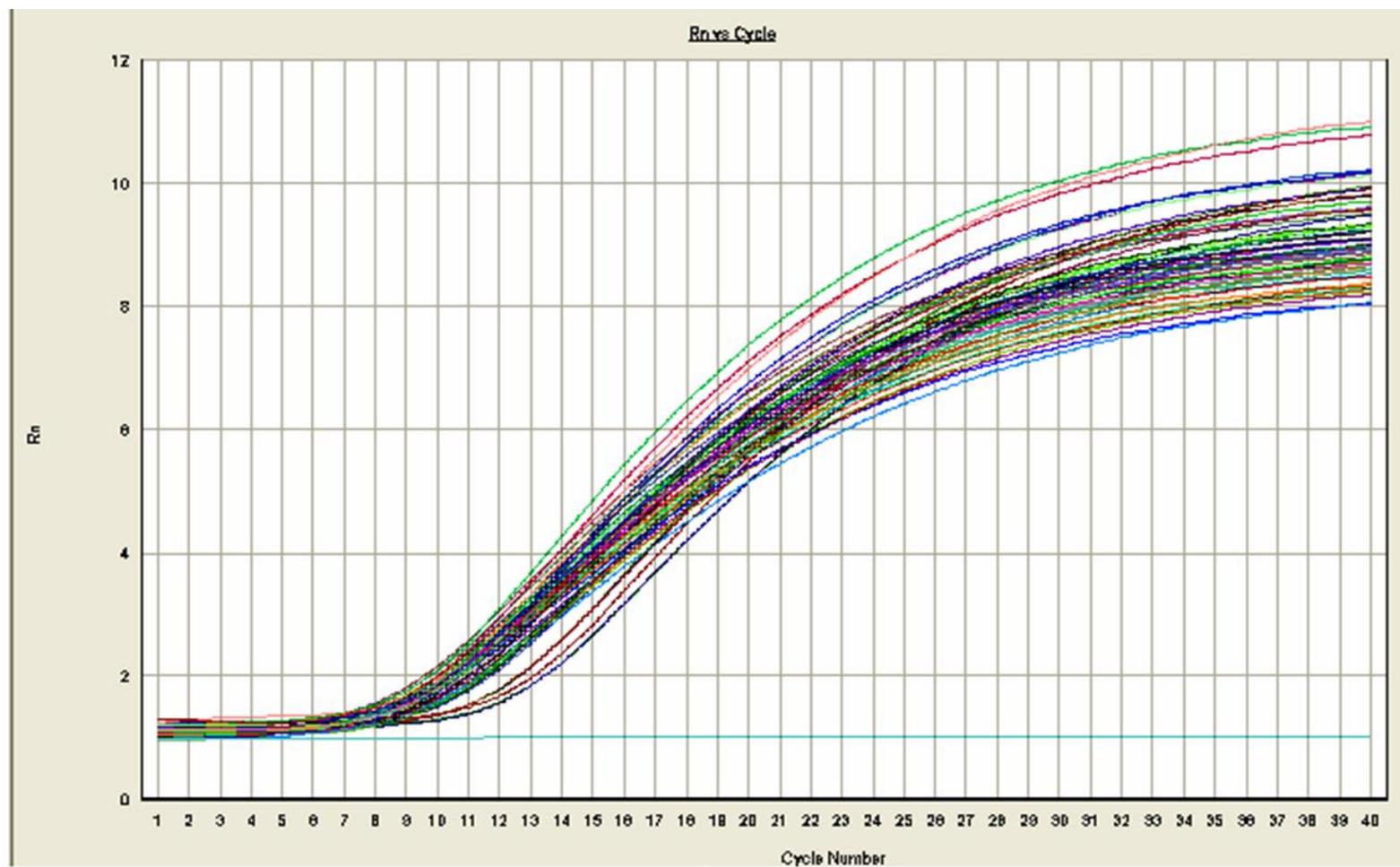


- ✓ Iniciadores reconhecem a cauda Poli A do mRNA;
- ✓ Enzima Transcriptase Reversa se liga adicionando oligonucleotídeos;
- ✓ Formação da fita de DNA Complementar.

Transcrição reversa



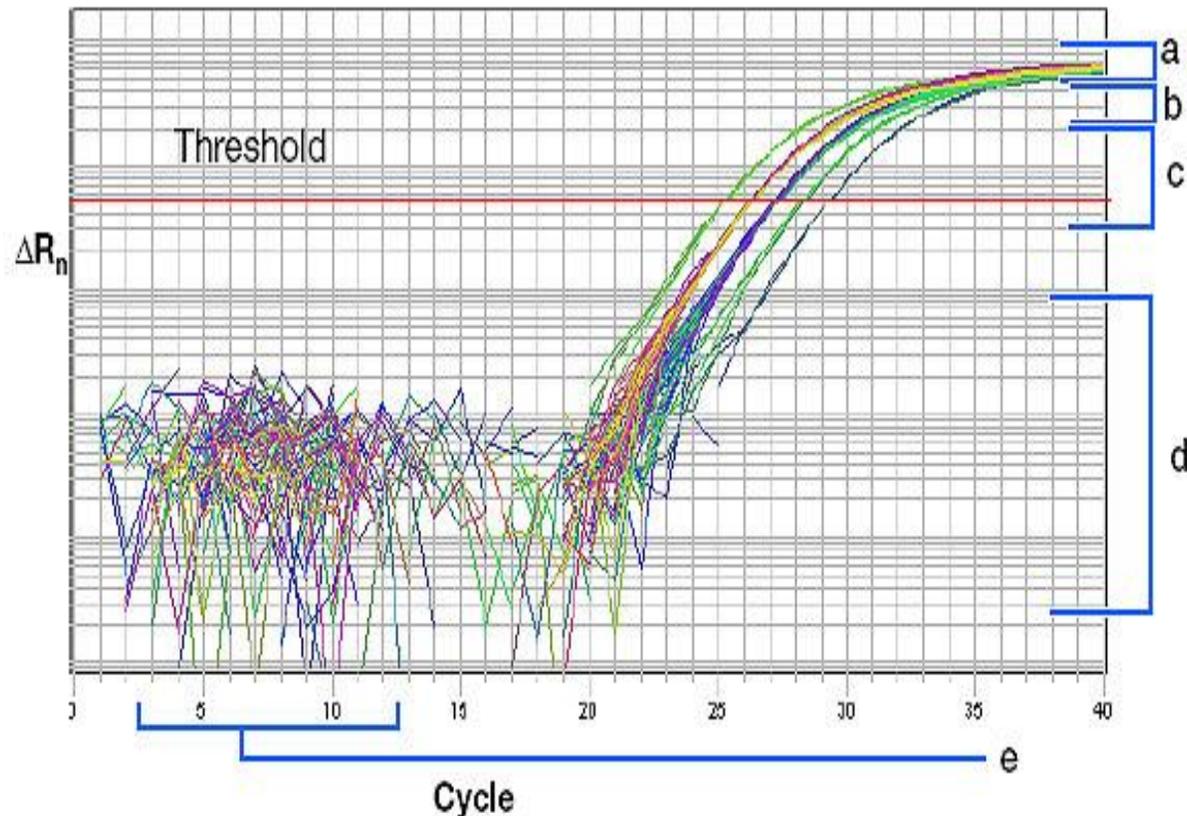
O que é isso?



Curva de Amplificação

Três fases distintas:

- **Linha basal:** não houve produtos da PCR suficiente para detectar fluorescência;
- **Fase Log:** a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e;
- **Fase Platô:** não há mais aumento no número de produtos.



- **Fase de Platô (a)**
- **Fase Linear phase (b)**
- **Fase Exponencial (geometric phase) (c)**
- **Background (d)**

Genes de Referência (Controle Endógeno)

- ❖ Expressão constitutiva (GAPDH, β -actina, 18S) – obrigatoriamente ter CT baixo
- ❖ **Corrigir:**
- ❖ degradação de material (RNA)
- ❖ variações da transcrição reversa
- ❖ presença de inibidores
- ❖ diferenças na quantificação de RNA
- ❖ **Normalização dos resultados**
- ❖ **Ct entre 17 e 23**

Column	Control Assay	Abbreviation
1	Internal Positive Control	IPC
2	18S rRNA	18S
3	Acidic ribosomal protein	huPO
4	Beta-actin	hu β A
5	Cyclophilin	huCYC
6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	huGAPDH
7	Phosphoglycerokinase	huPGK
8	β_2 -Microglobulin	hu β 2m
9	β -Glucuronidase	huGUS
10	Hypoxanthine ribosyl transferase	huHPRT
11	Transcription factor IID, TATA binding protein	huTBP
12	Transferrin receptor	huTfR

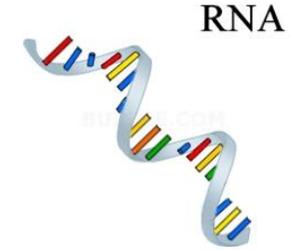
Cuidados na escolha do Gene de Referência

- ❖ Gene constantemente expresso;
- ❖ Verificar a expressão no seu tecido alvo;
- ❖ Aquele escolhido pelo seu amigo, pode não ser o melhor para seu estudo;
- ❖ Mais de um gene endógeno deve ser utilizado;
- ❖ Expressão gênica **não tenha variação entre os tecidos** submetidos a análise

Expressão em A = Expressão em B

$$\frac{\text{Expressão no Tratado}}{\text{Expressão no Controle}} = \sim 1$$

Expressão Gênica



Quantificação Absoluta

❖ Determinação do número exato de moléculas.

- Método para determinar o número exato de moléculas (cópias de mRNA ou ng de DNA).
- Determinar a concentração inicial de uma amostra de concentração desconhecida a partir de uma curva padrão de concentração conhecida. (Ex: Carga viral, detecção de patógenos).

Expressão Gênica

Quantificação Relativa

❖ Análise comparativa do mRNA alvo com o do controle/tratado (Calibrador)

- São comparados os Cts de cada amostra e os resultados representam ordens de grandeza (ex: 5x mais ou menos expressão de um determinado gene).
- Método Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- Software já calcula!



(Expression Suite - ThermoFisher®)

METHODS 25, 402–408 (2001)

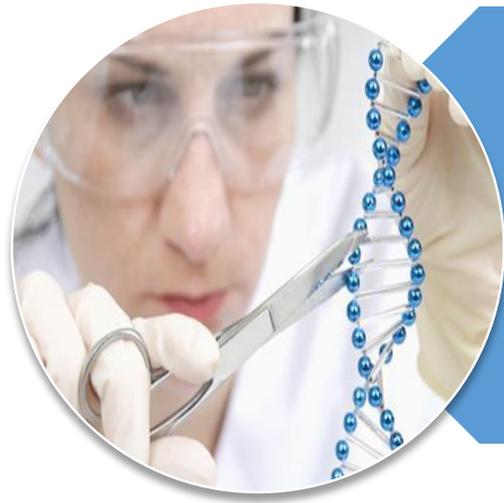
doi:10.1006/meth.2001.1262, available online at <http://www.idealibrary.com> on  IDEAL®

Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method

Kenneth J. Livak* and Thomas D. Schmittgen†¹

**Applied Biosystems, Foster City, California 94404; and †Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6534*

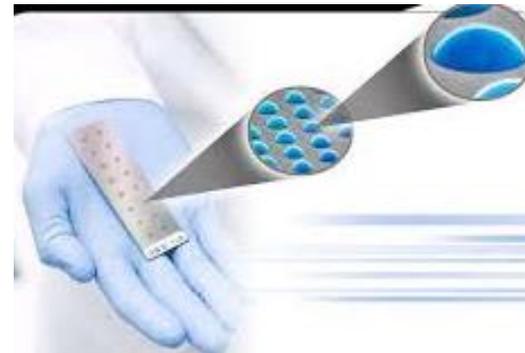
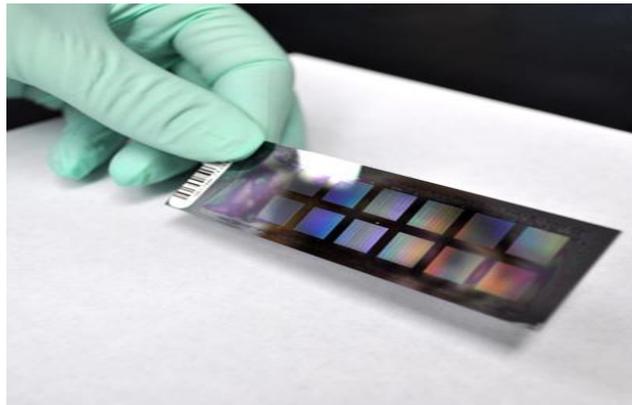
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C7 U PLA2... Ct. 30.31	C7 U PLA2... Ct. 30.41	C7 U PLA2... Ct. 30.58	C9B U PLA2... Ct. 31.31	C9B U PLA2... Ct. 31.21	C9B U PLA2... Ct. 31.09	1 C12 U PLA2... Ct. 32.47	1 C12 U PLA2... Ct. 32.22	1 C12 U PLA2... Ct. 33.42	C13 U PLA2... Ct. 29.45	C13 U PLA2... Ct. 28.96	C13 U PLA2... Ct. 29.05
B	C17 U PLA2... Ct. 30.06	C17 U PLA2... Ct. 29.98	C17 U PLA2... Ct. 30	CC2 U PLA2... Ct. 30.47	CC2 U PLA2... Ct. 30.44	CC2 U PLA2... Ct. 30.47	CC3 U PLA2... Ct. 30.5	CC3 U PLA2... Ct. 30.43	CC3 U PLA2... Ct. 30.62	C7 U SDMP... Ct. 30.47	C7 U SDMP... Ct. 30.66	C7 U SDMP... Ct. 30.94
C	C9B U SDMP... Ct. 30.96	C9B U SDMP... Ct. 31.06	C9B U SDMP... Ct. 31.12	C12 U SDMP... Ct. 33	C12 U SDMP... Ct. 32.73	C12 U SDMP... Ct. 32.61	C13 U SDMP... Ct. 29.39	C13 U SDMP... Ct. 29.49	1 C13 U SDMPDL Ct. Undete	2 C17 U SDMP... Ct. 28.95	1 C17 U SDMP... Ct. 30.23	1 C17 U SDMP... Ct. 30.22
D	CC2 U SDMP... Ct. 30.21	CC2 U SDMP... Ct. 30.54	CC2 U SDMP... Ct. 30.34	CC3 U SDMP... Ct. 30.31	CC3 U SDMP... Ct. 30.4	CC3 U SDMP... Ct. 30.33	C7 U PIK3R1 Ct. 27.97	C7 U PIK3R1 Ct. 28.1	C7 U PIK3R1 Ct. 28.18	C9B U PIK3R1 Ct. 27.33	C9B U PIK3R1 Ct. 27.01	C9B U PIK3R1 Ct. 26.94
E	C12 U PIK3R1 Ct. 27.2	C12 U PIK3R1 Ct. 27.46	C12 U PIK3R1 Ct. 27.69	C13 U PIK3R1 Ct. 25.84	C13 U PIK3R1 Ct. 25.79	C13 U PIK3R1 Ct. 25.76	C17 U PIK3R1 Ct. 26.91	C17 U PIK3R1 Ct. 26.7	C17 U PIK3R1 Ct. 26.65	CC2 U PIK3R1 Ct. 26.06	CC2 U PIK3R1 Ct. 26.01	CC2 U PIK3R1 Ct. 26.03
F	CC3 U PIK3R1 Ct. 26.63	CC3 U PIK3R1 Ct. 26.72	CC3 U PIK3R1 Ct. 26.72	C7 U RICTOR Ct. 29.42	C7 U RICTOR Ct. 29.26	C7 U RICTOR Ct. 29.05	C9B U RICTOR Ct. 27.57	C9B U RICTOR Ct. 27.83	C9B U RICTOR Ct. 27.41	C12 U RICTOR Ct. 27.93	C12 U RICTOR Ct. 27.79	C12 U RICTOR Ct. 28.18
G	C13 U RICTOR Ct. 25.68	C13 U RICTOR Ct. 25.77	C13 U RICTOR Ct. 26.19	C17 U RICTOR Ct. 25.8	C17 U RICTOR Ct. 26.19	C17 U RICTOR Ct. 26.23	CC2 U RICTOR Ct. 27.79	CC2 U RICTOR Ct. 27.97	CC2 U RICTOR Ct. 28.06	CC3 U RICTOR Ct. 27.99	CC3 U RICTOR Ct. 28.29	CC3 U RICTOR Ct. 28.39
H	C12 U GAPDH Ct. 23.96	C12 U GAPDH Ct. 23.98	C12 U GAPDH Ct. 23.82	C12 U BACTI... Ct. 20.68	C12 U BACTI... Ct. 20.89	C12 U BACTI... Ct. 20.97	N BACTIM... Ct. Undete	N GAPDH Ct. Undete	N RICTOR Ct. Undete	N PIK3R1 Ct. Undete	N SDMPDL Ct. Undete	N PLA2G4 Ct. Undete



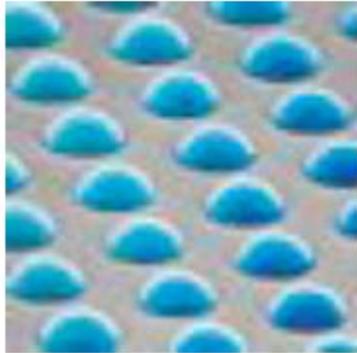
Microarray

O que é tecnologia de microarray?

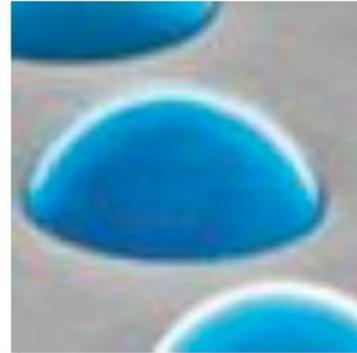
- Ferramenta que permite investigar SIMULTANEAMENTE a expressão de centenas ou milhares de genes em uma amostra.
- Hibridação de genes marcados a uma série de sondas de DNA immobilizadas em uma matriz sólida, que representam os genes de interesse.



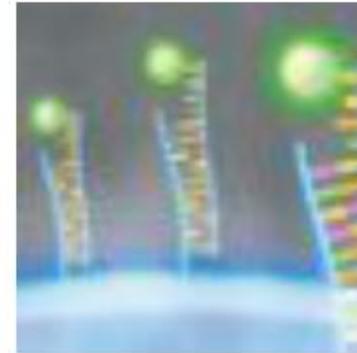
- ✓ Cada Bead é coberta com milhares de cópias de oligonucleotídeos específicos



Milhares de sequências conhecidas de genes são aplicados em micro vasos de cada lâmina do array.

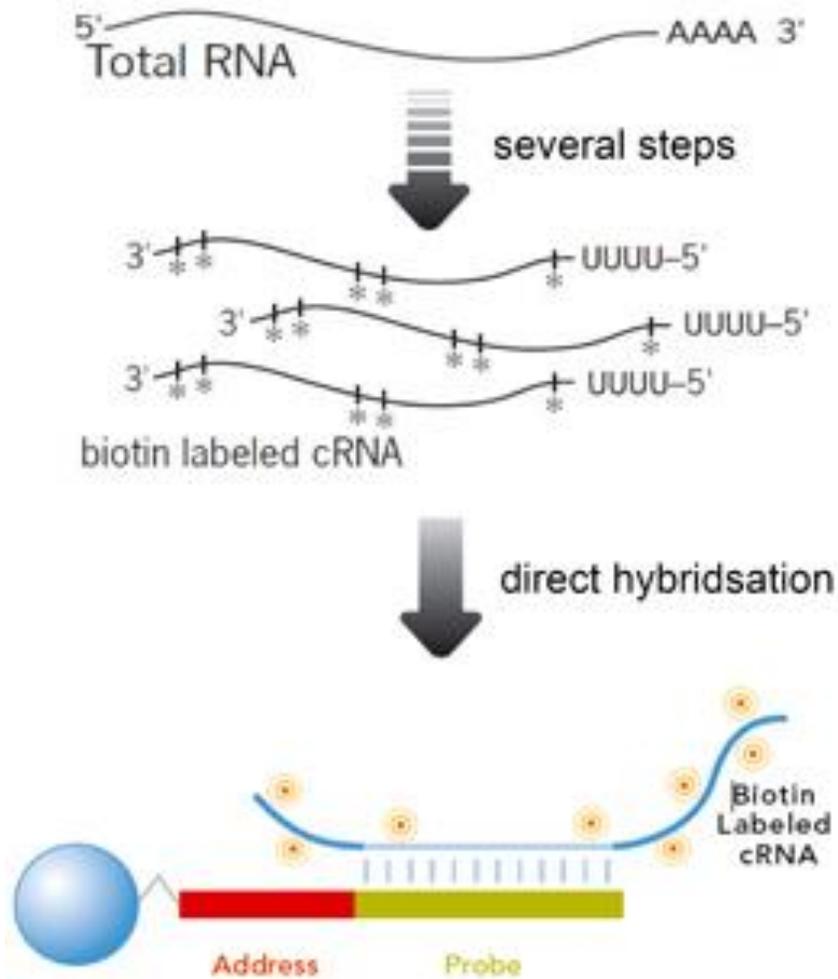


Análise de múltiplas vias simultaneamente.



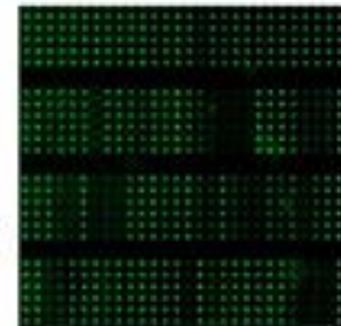
As moléculas das amostras ligam-se, hibridizando com moléculas das Beads do Chip.

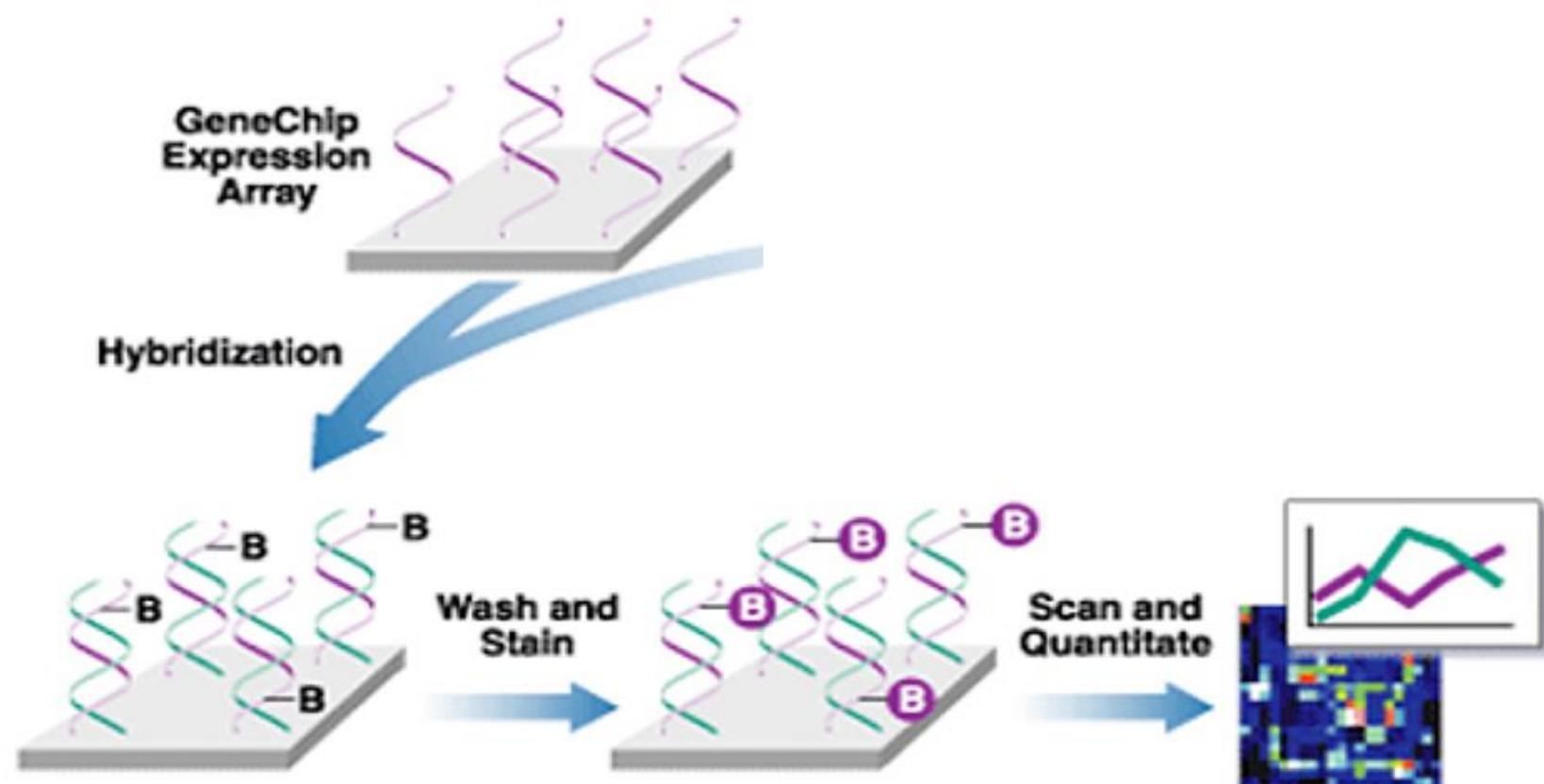
Transcriptoma



Protocolo de 1 semana
R\$22.000,00 – 16 amostras

Streptavidin-Cy3
labeling



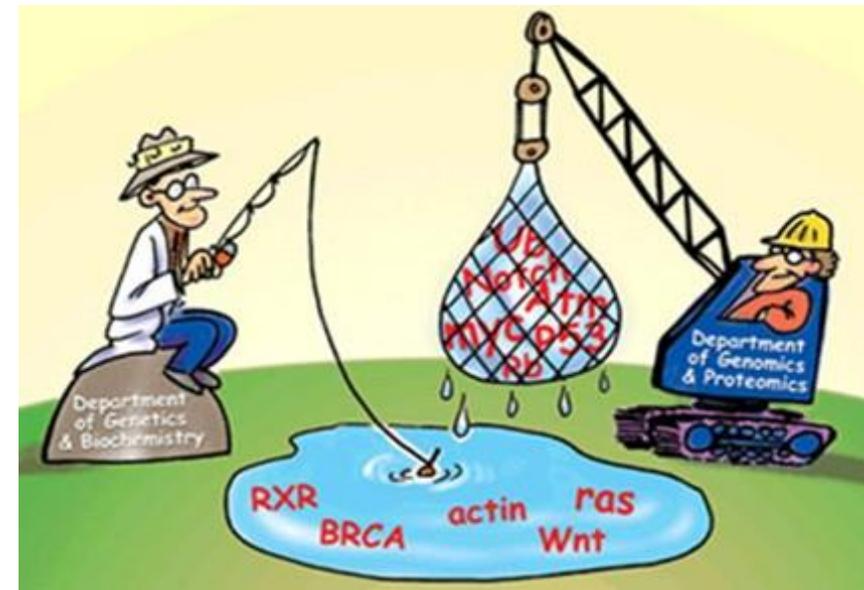


iSCAN - Illumina®



Aplicações Microarray - LEN

- Transcriptoma (47.000)
- SNPs (Genoma – 5 milhões)
- Epigenética (Metiloma – 850 mil)

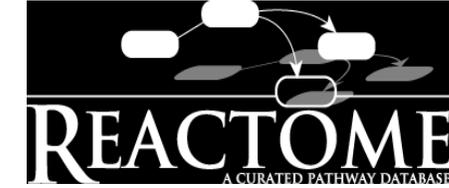


Análise dos Dados

Necessidade de sistemas computacionais para análise dos dados e interpretação dos resultados.

Desafios:

- ✓ Armazenar e organizar;
- ✓ Estabelecer relações;
- ✓ Analisar;
- ✓ Desenvolver mecanismos de visualização (gráficos, mapas).



INGENUITY®

BaseSpace

CORRELATION ENGINE



Validação do experimento



Toda análise de alto rendimento (*high throughput*)
necessita de **Validação!**

✓ **PCR em tempo Real**

Ex: Expressão gênica – escolha de 7 a 10 genes para validar

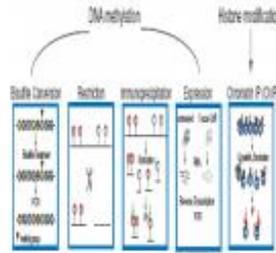
Exigência para Publicação!!



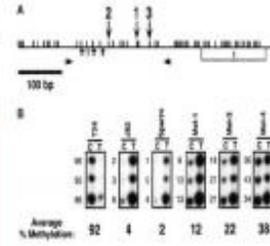
Metilação



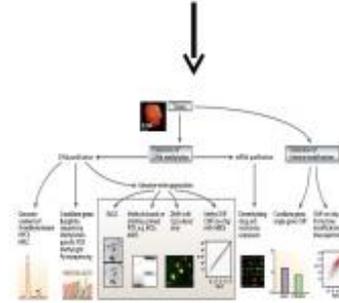
MSP



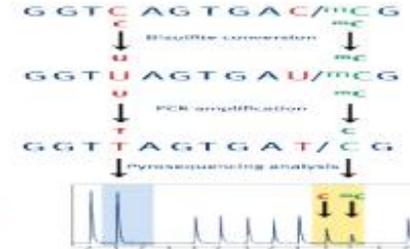
COBRA



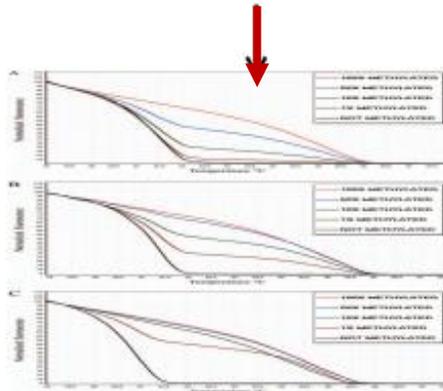
Ms-SNuPE



Sequenciamento



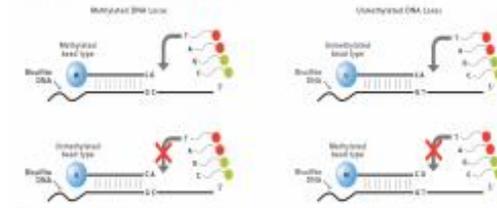
Pirosequenciamento



HRM

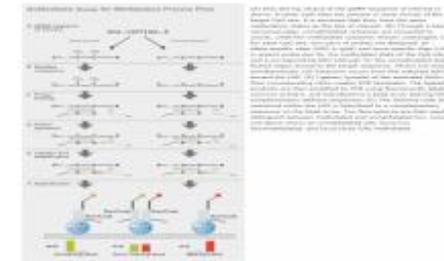
Plataforma Illumina

FIGURE 1. THE INFINIUM ASSAY FOR METHYLATION



The Infinium Assay for Methylation detects methylation status at individual CpG loci by typing bisulfite-converted DNA. Methylation protects C from conversion to T, whereas unmethylated C is converted to T (right). A pair of bead-bound probes is used to detect the presence of T or C by hybridization followed by single-base extension with a labeled nucleotide.

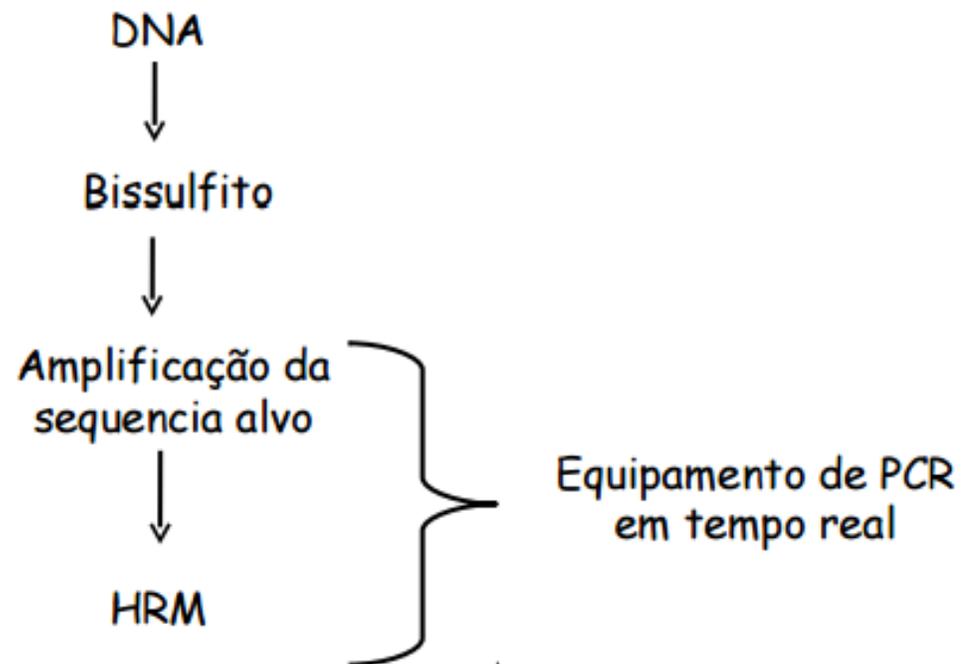
Infinium



GoldenGate

Methylation Sensitive High Resolution Melting (Ms-HRM)

Técnica baseada no comportamento de dissociação do dsDNA em ssDNA com o aumento da temperatura

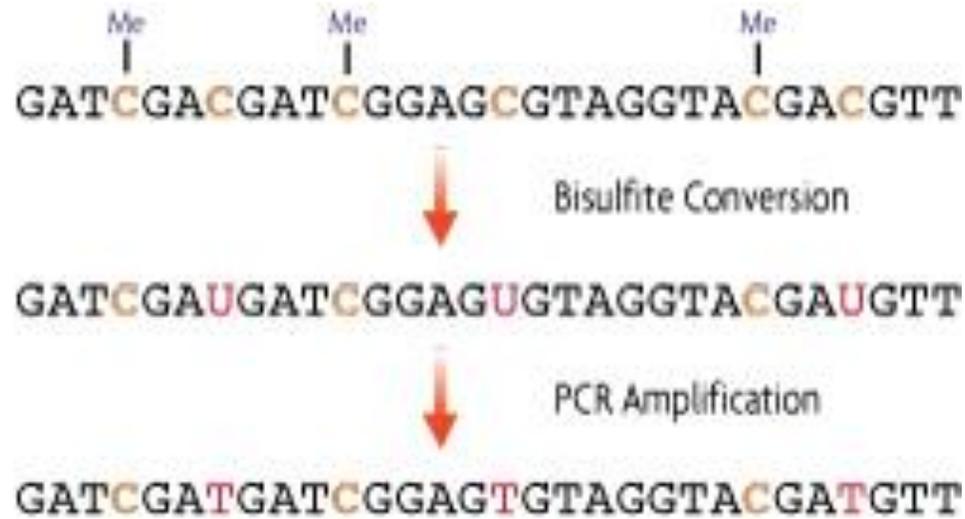


Preparo das amostras

Tratamento com bissulfito de sódio

C → U

mC → mC



Chemical-based denaturation of DNA



Treatment of DNA with sodium bisulfite



Capture and cleaning of converted DNA



Elution of converted DNA



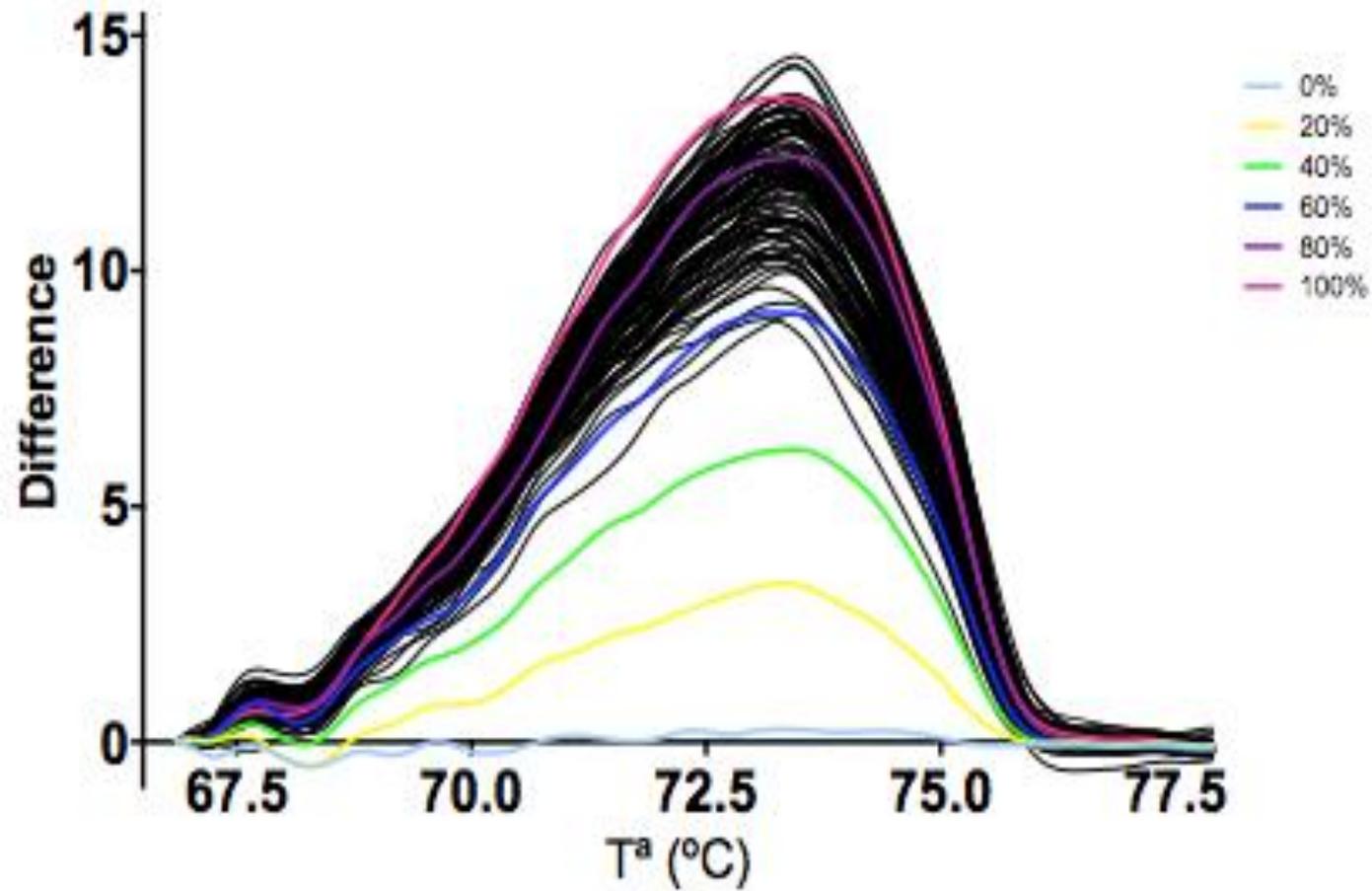
Escolha do Gene de Interesse

Table 1

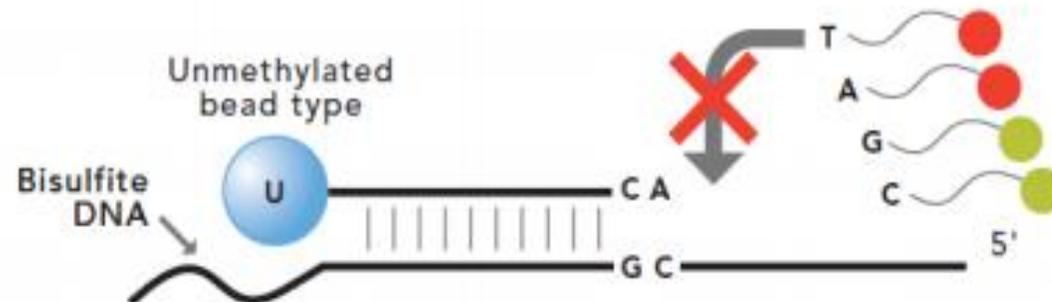
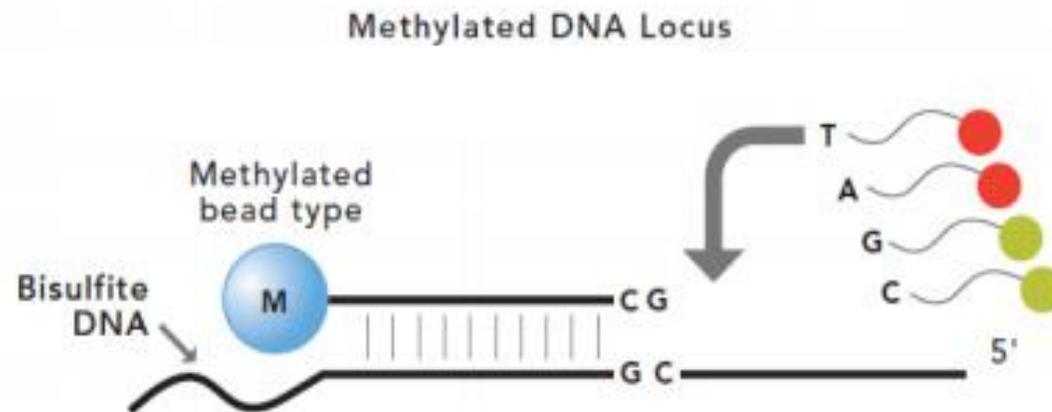
Primer sequences for MeCap-qPCR. Primers were designed to bind in the region -1,000 to -1 relative to the TSS and to not cover AluI restriction sites

Target gene	Accession number (NCBI)	Length of PCR product (in base pairs)	Primer sequence
<i>PPARGCIA</i>	NM_013261.3	121	Fwd 5'-TAATCACAGCATGATGCTTGAAG-3' Rev 5'-AGGCAGCCCTCTGCTTCAGTGA-3'
<i>PDK4</i>	NM_002612.3	112	Fwd 5'- AAAGCCCTGCTCTGAGCAAGG -3' Rev 5'-GCCCTTGTTTACAACCTCGGAGGC-3'
<i>TFAM</i>	NM_003201.2	93	Fwd 5'-CCCTGGCTTGAAGTGAAGACGCT-3' Rev 5'-GGCTGTACGTAACAGACAGTCCT-3'
<i>TNF</i>	NM_000594.3	80	Fwd 5'-ATCCTGTCTGGAAATTAGAAGGA-3' Rev 5'-ATGCCCCTCAAAACCTATTG-3'
<i>IL1 A</i>	NM_000575.3	80	Fwd 5'-GACTACAGGGGCATGCCATC-3' Rev 5'-TGGGTTCCCAGTTGGAGTTT-3'
<i>IL6</i>	NM_000600.3	100	Fwd 5'-AGGTGGGCATGGATTTTCAAG-3' Rev 5'-GGGCCGACTAGACTGACTTC-3'

Análise dos resultados pela Curva de *Melting*

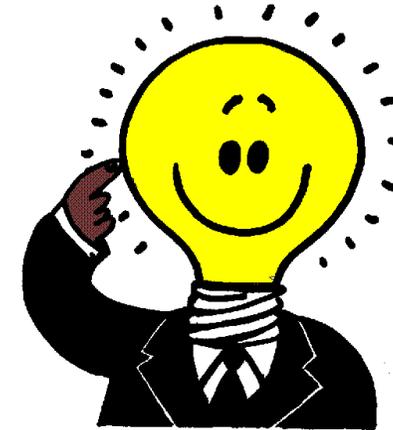


Plataforma Illumina – Análise em larga escala



Protocolo de 1 semana
R\$22.000,00 – 16 amostras

O que é importante saber?



- ✓ Teoria e as diferenças entre as técnicas;
- ✓ Vantagens e Desvantagens de cada uma;
- ✓ Como aplicar a técnica escolhida para responder os seus objetivos;
- ✓ Aplicações gerais e específicas;
- ✓ Boas práticas laboratoriais – SEMPRE!!!

