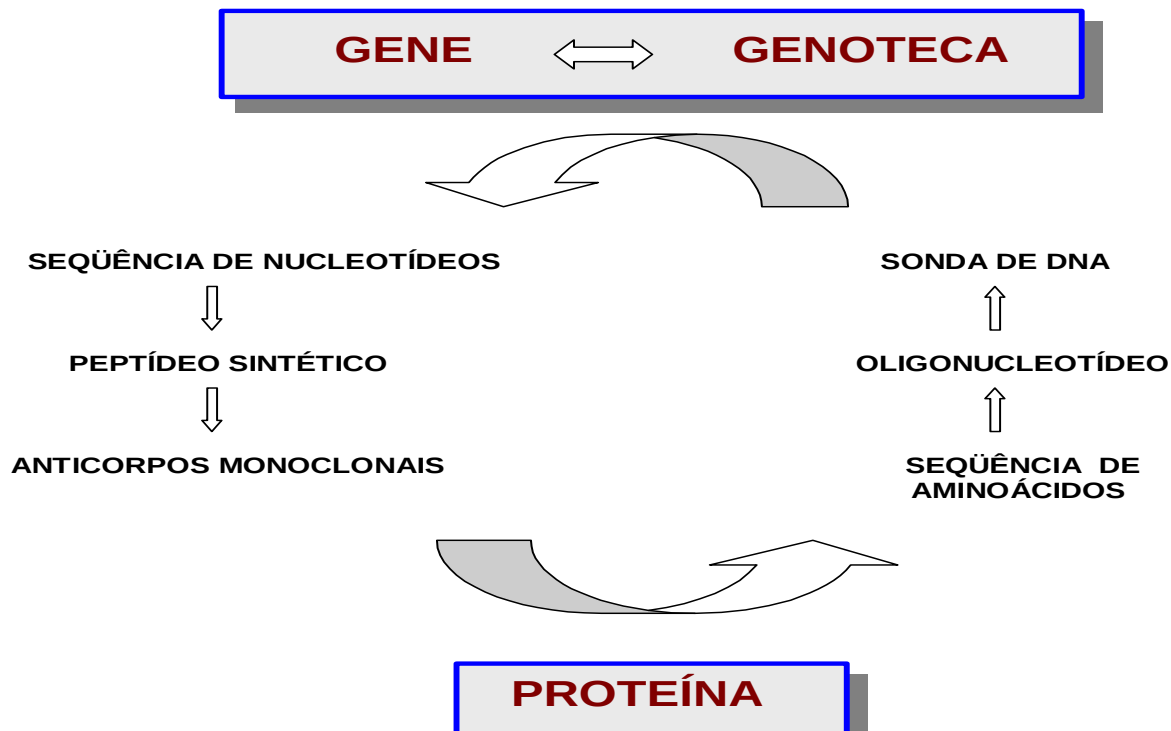


Aplicação das Técnicas de Biologia Molecular no diagnóstico de Doenças Infecciosas: Digestão de DNA / Clonagem / Genotecas

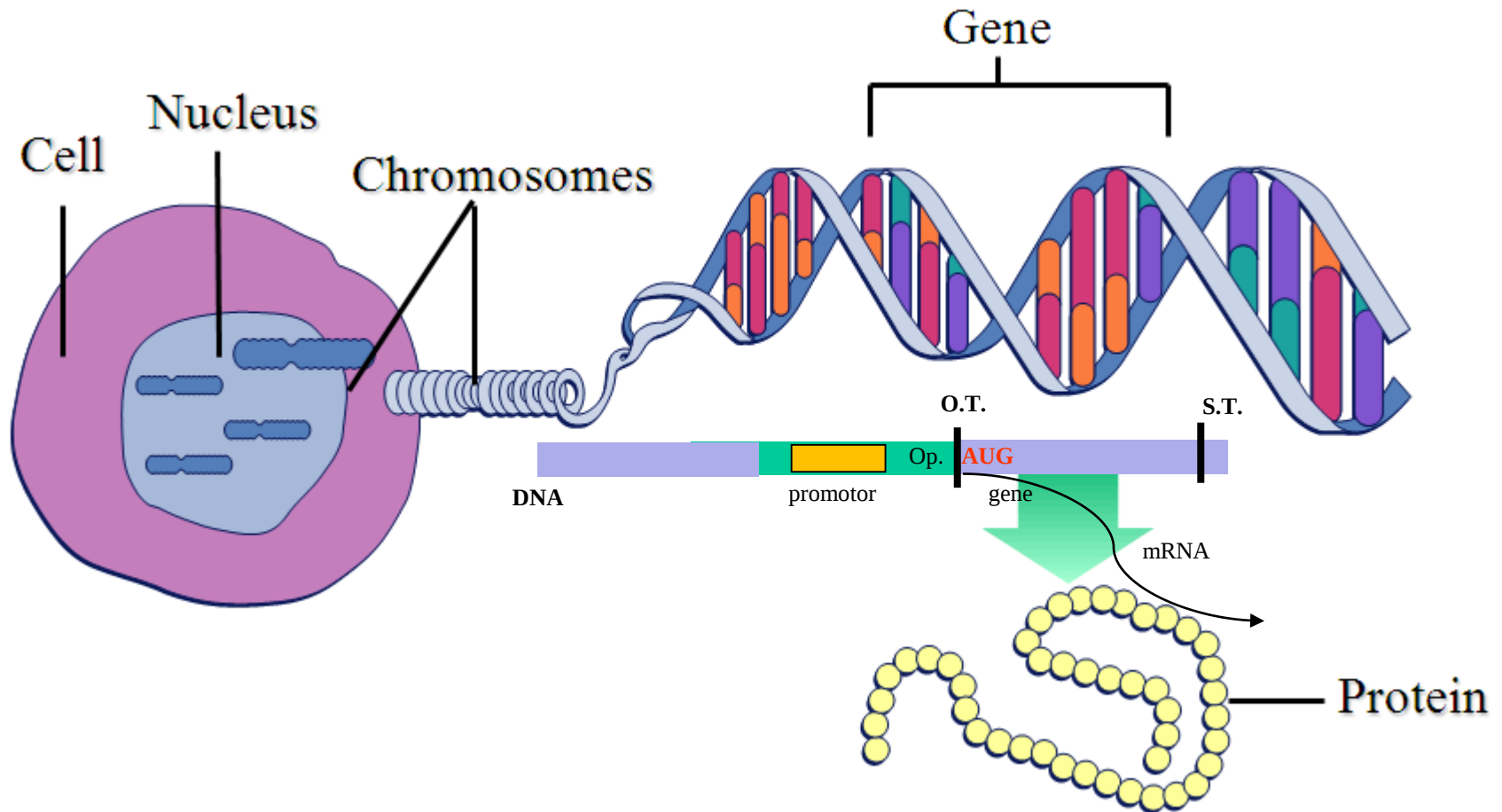


Princípios básicos de Biologia Molecular

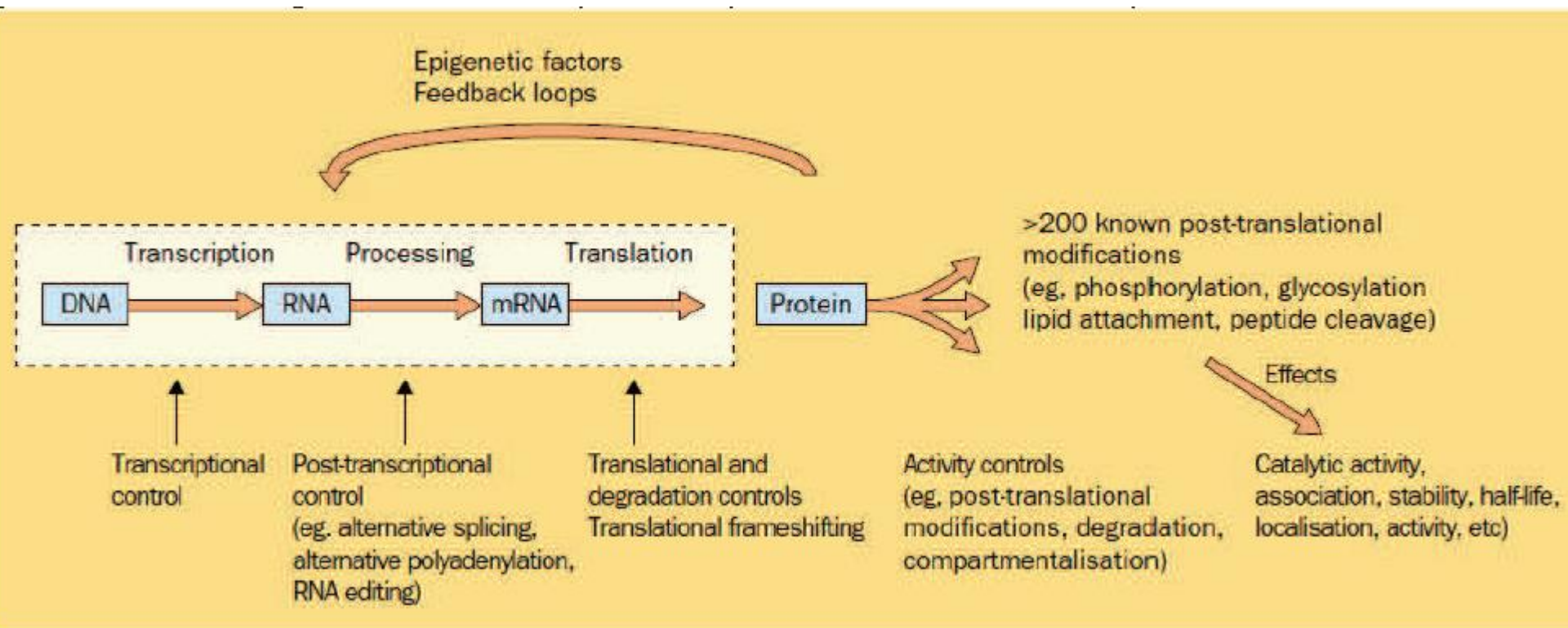
Como já foi bastante comentado, os métodos de biologia molecular dependem do (e foram desenvolvidos com base no) entendimento das propriedades das moléculas biológicas



Cromossomo - gene - DNA - RNA - Proteína



Pós - genômica





Pós - genômica

Genômica → identificação e sequenciamento de genes

Proteômica → identificação e sequenciamento de proteínas





Pós - genômica :
Proteômica
Bio informática



Proteômica

Necessidade de investigar o controle da expressão gênica e seus impactos no metabolismo celular

Pode gerar informações importantes sobre:

- Quais proteínas são expressas.
- Níveis de expressão dessas proteínas.
- Modificações pós-traducionais - fosforilação / glicosilação / etc.
- Respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos.
- Diferenças moleculares entre linhagens celulares.
- Interação gênica.



Proteômica



Análise de proteínas por Espectrometria de Massas (MALDI-ToF)





Bio - informática

- Junção da ciência computacional com Bio-Mol. Utiliza conhecimentos da física, biologia, química, informática, ciência da computação e matemática.
- É também chamada de Biologia “*in Silico*”
- Buscando tratar os dados, desenvolve softwares para:
 - Identificar genes
 - Prever a configuração tridimensional de proteínas
 - Organizar e relacionar informação biológica
 - Agrupar sequências homólogas
 - Montar árvores filogenéticas
 - Analisar experimentos de expressão gênica





NCBI Website

National Center for Biotechnology Information - Mozilla Firefox

Editar Exibir Histórico Favoritos Ferramentas Ajuda

login nas Contas do Google

National Center for Biotechnology Inf... x +

www.ncbi.nlm.nih.gov

Google

S - MEC CNPq Facebook FAPESP - FAPESP \$\$\$\$ Folha Gmail Google IMT-USP USP Mail PubMed Buscapé Previsão-SP iCarros Suplemento FFM

NCBI Resources How To



National Center for
Biotechnology Information

All Databases

Search

NCBI Home

Resource List (A-Z)

All Resources

Chemicals & Bioassays

Data & Software

DNA & RNA

Domains & Structures

Genes & Expression

Genetics & Medicine

Genomes & Maps

Homology

Literature

Proteins

Sequence Analysis

Taxonomy

Training & Tutorials

Variation

Welcome to NCBI

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.

[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [Research](#) | [NCBI News](#)

Get Started

- [Tools](#): Analyze data using NCBI software
- [Downloads](#): Get NCBI data or software
- [How-To's](#): Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- [Submissions](#): Submit data to GenBank or other NCBI databases

NCBI Twitter feed

Keep up-to-date on data updates, resource announcements, and other information about what is going on at the NCBI.

GO



1 2 3 4 5 6 7 8

Popular Resources

[PubMed](#)

[Bookshelf](#)

[PubMed Central](#)

[PubMed Health](#)

[BLAST](#)

[Nucleotide](#)

[Genome](#)

[SNP](#)

[Gene](#)

[Protein](#)

[PubChem](#)

NCBI Announcements

Coffee Break tutorial: Brown fat and obesity

The latest Coffee Break tutorial

New NCBI YouTube video: Creating databases for BLAST

In the newest NCBI video on YouTube



Software BLAST

basic local alignment search tool

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - Mozilla Firefox

Arquivo Editar Exibir Histórico Favoritos Ferramentas Ajuda

Fazer login nas Contas do Google

BLAST: Basic Local Alignment Search ...

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Google

CAPES - MEC CNPq Facebook FAPESP - FAPESP \$\$\$\$ Folha Gmail Google IMT-USP USP Mail PubMed Buscapé Previsão-SP iCarros Suplemç FFM

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/ BLAST Home

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

New DELTA-BLAST, a more sensitive protein-protein search Go

BLAST Assembled RefSeq Genomes

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#).

- [Human](#)
- [Mouse](#)
- [Rat](#)
- [Arabidopsis thaliana](#)
- [Oryza sativa](#)
- [Bos taurus](#)
- [Danio rerio](#)
- [Drosophila melanogaster](#)
- [Gallus gallus](#)
- [Pan troglodytes](#)
- [Microbes](#)
- [Apis mellifera](#)

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

- | | |
|----------------------------------|--|
| nucleotide blast | Search a nucleotide database using a nucleotide query
<i>Algorithms:</i> blastn , megablast , discontiguous megablast |
| protein blast | Search protein database using a protein query
<i>Algorithms:</i> blastp , psi-blast , phi-blast , delta-blast |
| blastx | Search protein database using a translated nucleotide query |
| tblastn | Search translated nucleotide database using a protein query |
| tblastx | Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query |

Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

Your Recent Results [New!](#)

[All Recent results...](#)

News

[BLAST XML](#)

Changes to the BLAST XML have
Wed, 12 Mar 2014 15:00:00 EST

[More BLAST news...](#)

Tip of the Day

[Using Tree View to Examine Relationships Between Sequences.](#)

The new Tree View option on the service presents a dendrogram that clusters sequences according to the query sequence.

[More tips...](#)



mas como conseguir esses dados ????

GENE

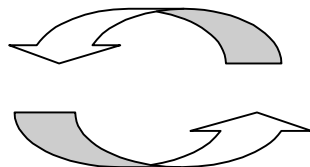


Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR :

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot



PROTEÍNA



Síntese de Peptídeos

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :

Tecnologia do DNA Recombinante -

Ferramentas Biotecnológicas - *enzimas; vetores,*

Fontes de DNA - *genotecas; DNA sintético*

Seleção de um clone - *varredura (screening)*

Expressão do produto gênico -

Aplicações da Engenharia Genética - *em terapia e diagnóstico médico*

Questões de Segurança e Ética -

O Futuro da Biotecnologia



Clonagem molecular: DEFINIÇÃO

Definição de clonagem molecular: A clonagem molecular é o processo de construção de moléculas de DNA recombinante e da sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitam a seleção do DNA recombinante.

Esta tecnologia permite estudar os genes e os seus produtos, obter organismos transgênicos e realizar terapia gênica.

Expressões utilizadas com o mesmo significado:

- clonagem molecular
- engenharia genética
- manipulação gênica
- clonagem gênica
- tecnologia do DNA recombinante
- modificação genética



Clonagem molecular: VIABILIZAÇÃO

descobertas e desenvolvimentos importantes para viabilizar o processo de clonagem molecular

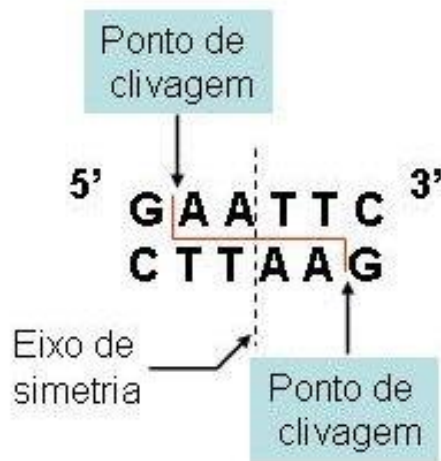
Genoteca



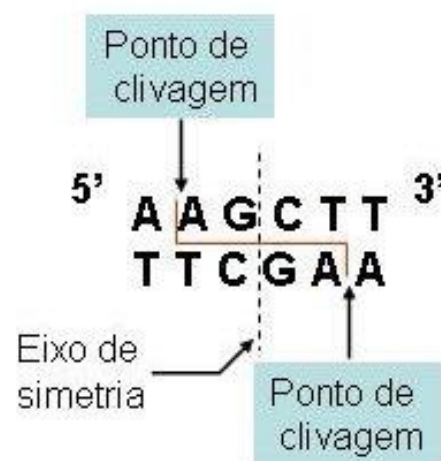
1 - Genoteca: **genômica** – Enzimas de restrição

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

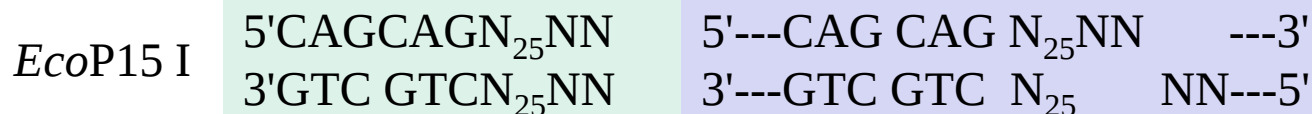
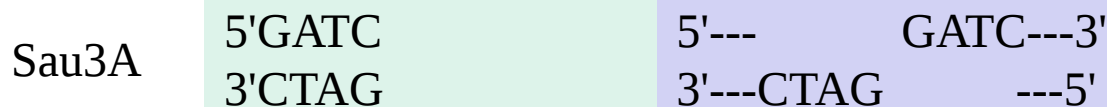
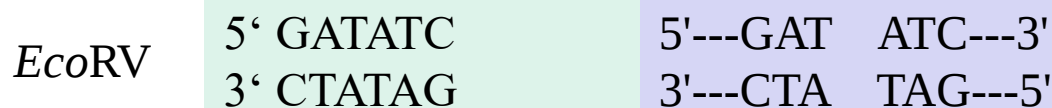
Eco RI



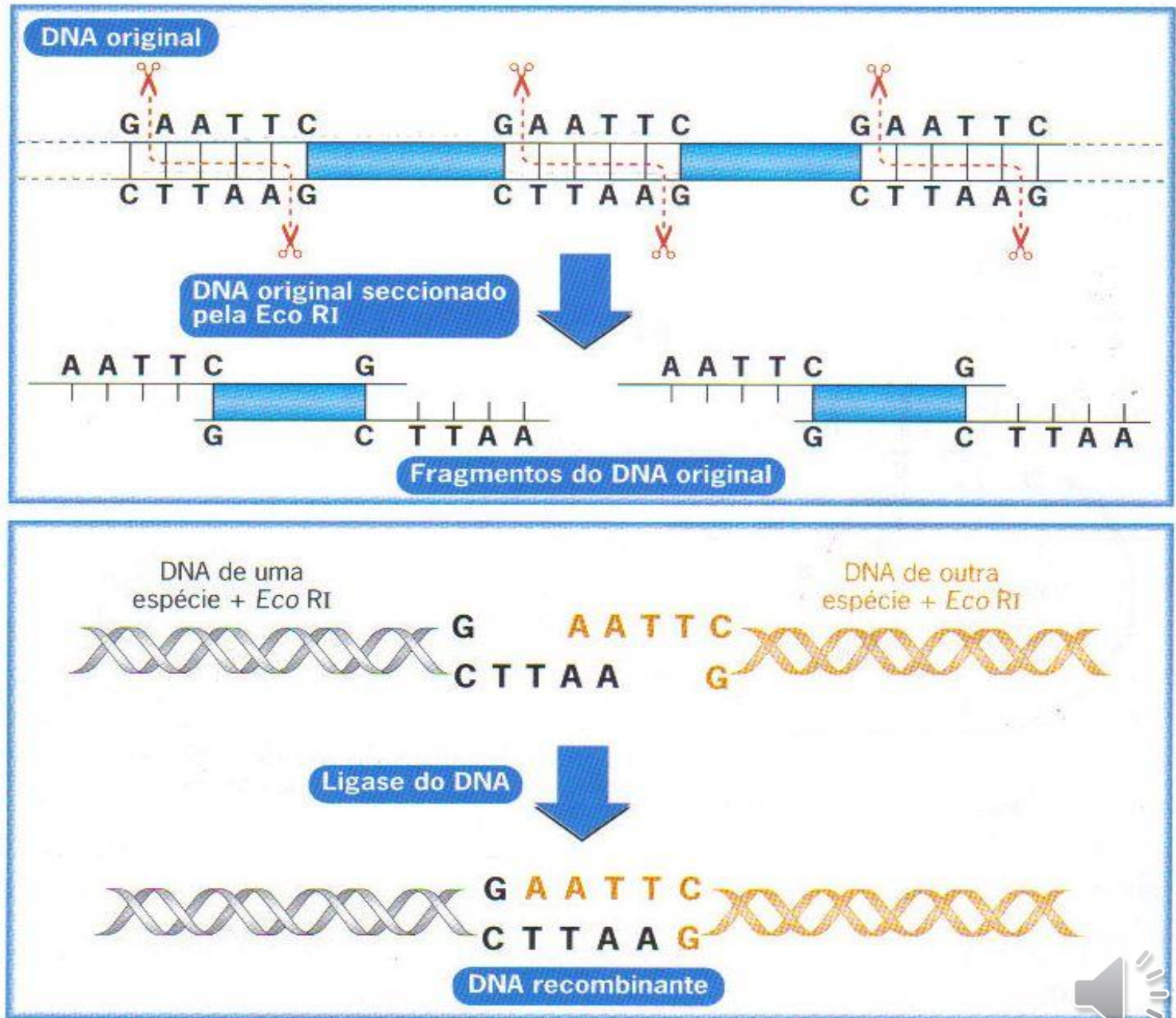
Hind III



EcoRI	Significado	Descrição
E	<i>Escherichia</i>	Gênero
co	<i>coli</i>	Espécie
R	RY13	Cepa
I	1ª identificada	Ordem de identificação



1 - Genoteca: genômica - Enz. restrição



Clonagem molecular: VIABILIZAÇÃO

descobertas e desenvolvimentos importantes para viabilizar o processo de clonagem molecular

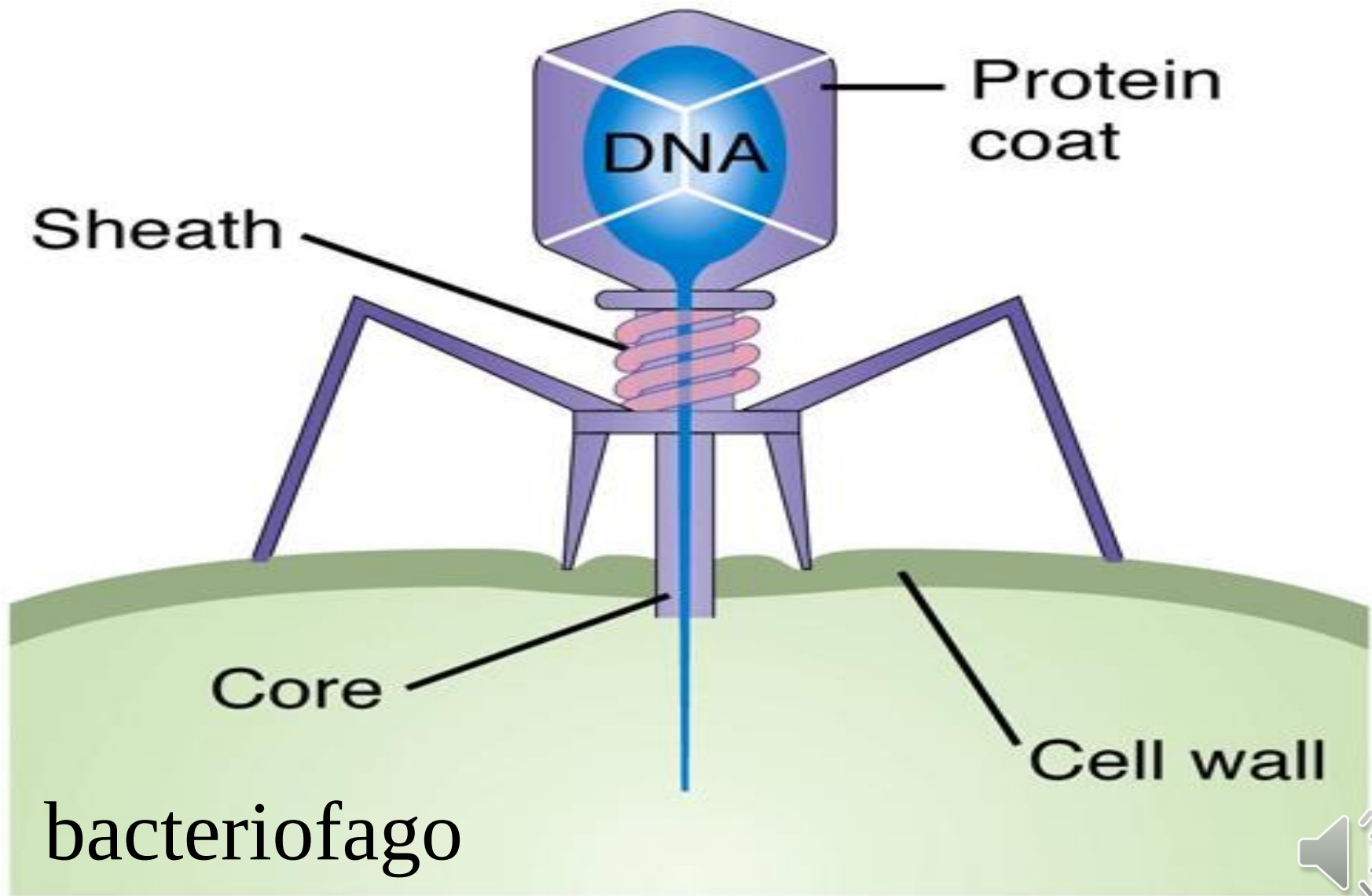
~~1- Sistemas de Restrição e de Modificação (Enzimas de Restrição, Ligase, Polimerases, etc)~~

2- Vetores de Clonagem ?????????

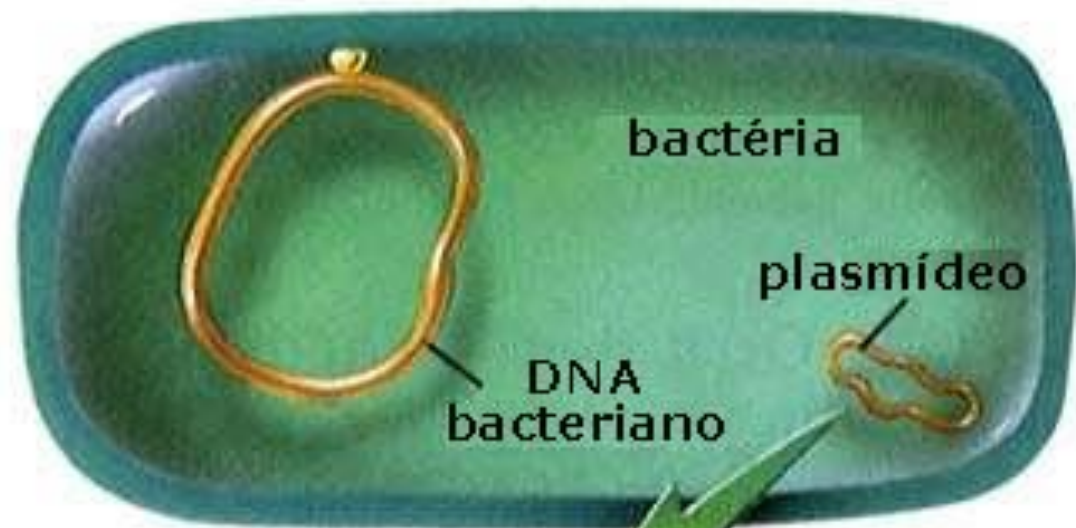
3- Métodos de transformação de células eucarióticas e procarióticas



O que é um vetor ????????????



vetor plasmídio



Os *plasmídeos* ou plasmídios são moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico



1 μ m



Clonagem molecular: VIABILIZAÇÃO

descobertas e desenvolvimentos importantes para viabilizar o processo de clonagem molecular

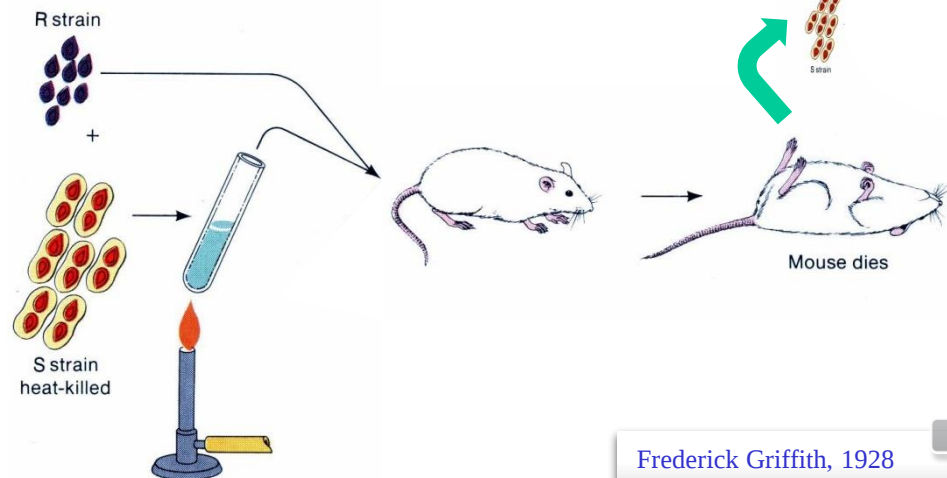
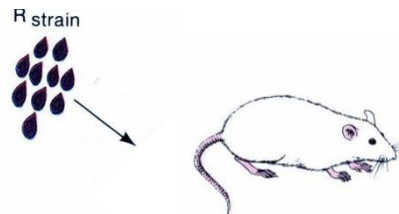
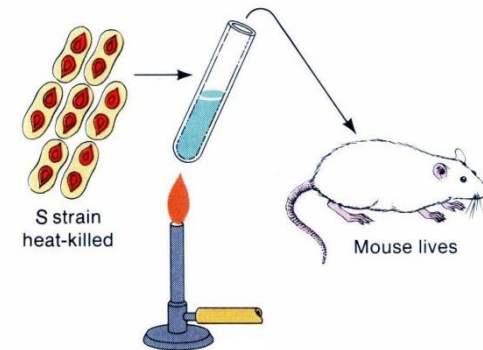
~~1- Sistemas de Restrição e de Modificação (Enzimas de Restrição, Ligase, Polimerases, etc)~~

~~2- Vetores de Clonagem~~

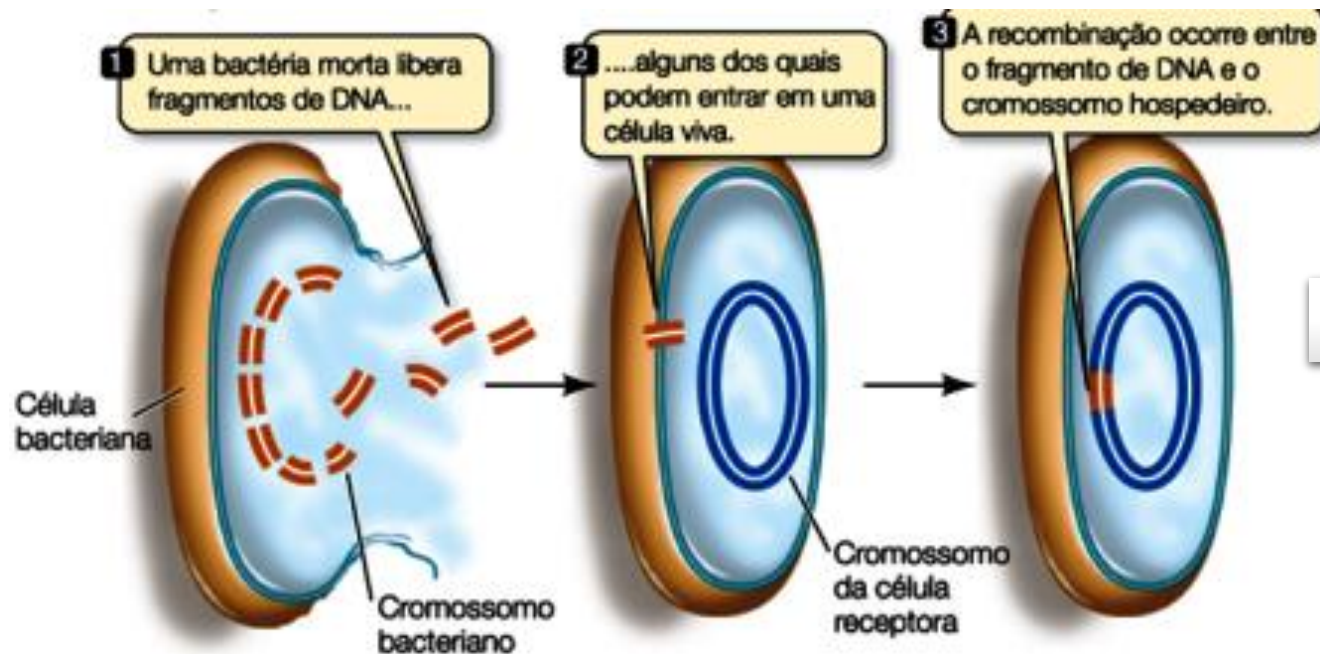
3- Métodos de transformação de células eucarióticas e procarióticas **????????**



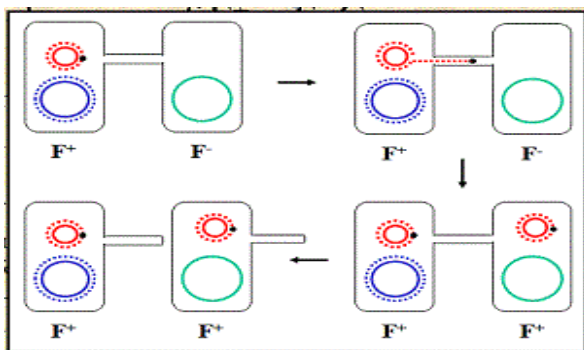
A descoberta do 'princípio transformante' em bactérias



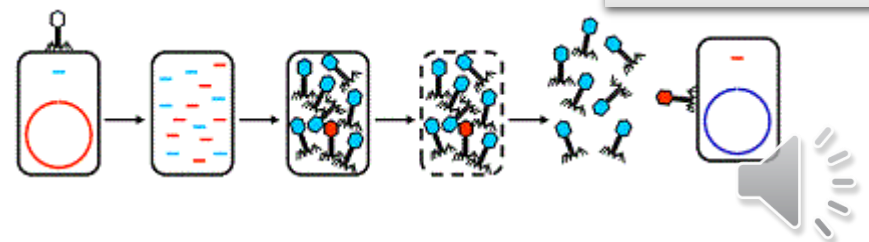
A recombinação gênica em bactérias



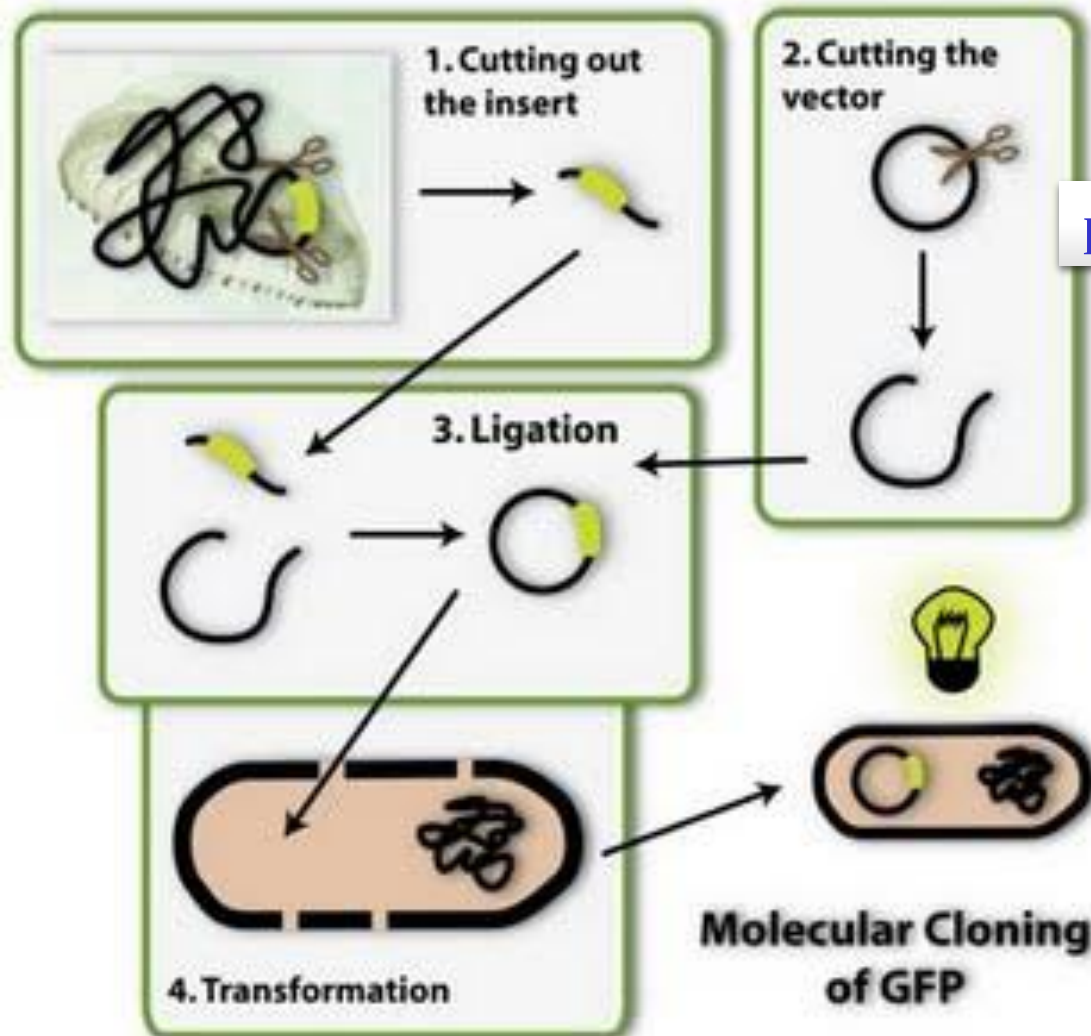
transformação



conjugação



Etapas na construção de uma Genoteca



plasmídio

Plasmídeos: moléculas de DNA circular capazes de reprodução independente do DNA bacteriano



E pra que tudo isso ?????

Informação



sobre um gene ou sobre um produto gênico

GENE

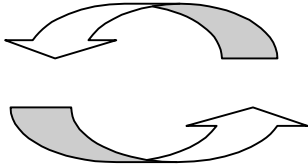


Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR :

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot



PROTEÍNA



Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :

Tecnologia do DNA Recombinante - CLONAGEM

Ferramentas Biotecnológicas - *enzimas; vetores,*

Fontes de DNA - *genotecas; DNA sintético*

Seleção de um clone - *varredura (screening)*

Expressão do produto gênico -

Aplicações da Engenharia Genética - *em terapia e diagnóstico médico*

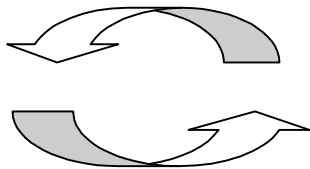
Questões de Segurança e Ética -

O Futuro da Engenharia Genética -



Padrão de Digestão : RFLP

GENE



PROTEÍNA

Padrão de Digestão : RFLP

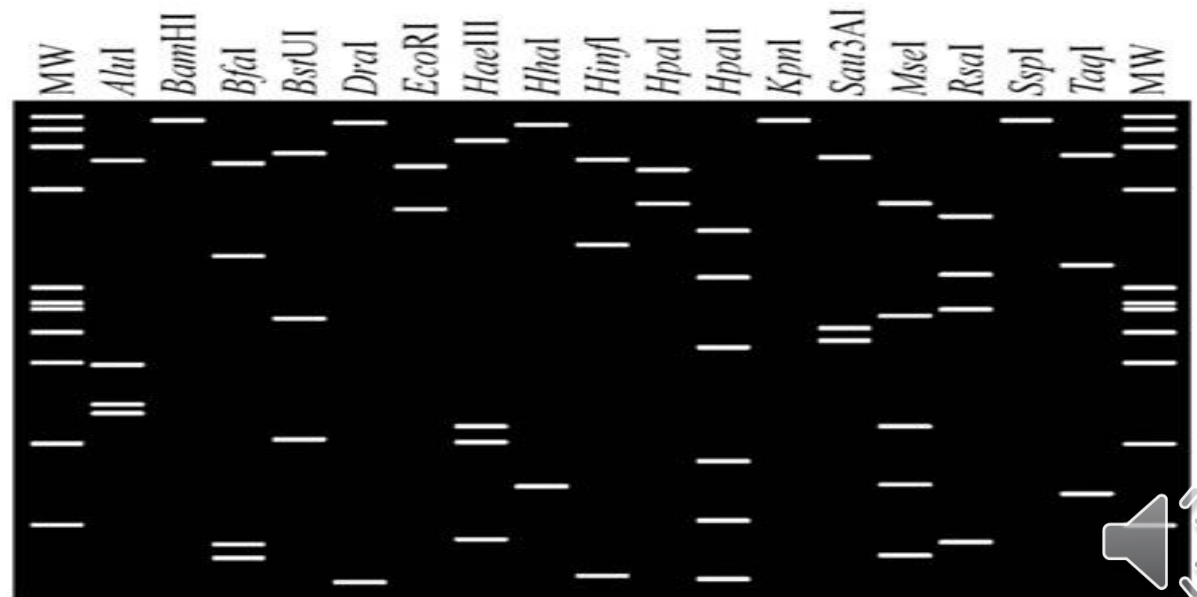
Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR :

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :

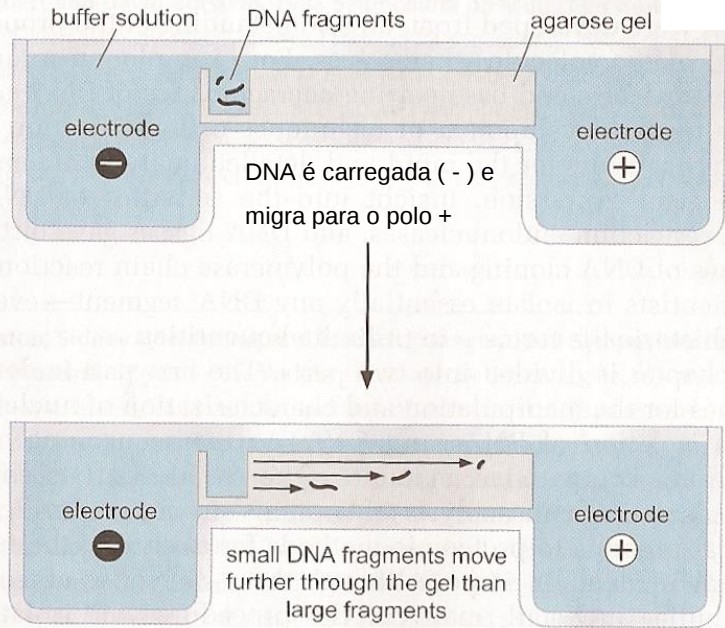


16SrII-C Cactus witches'-broom phytoplasma (EU099547)



Separação de moléculas de DNA e RNA por tamanho

Qdo submetidas a um campo elétrico em material poroso



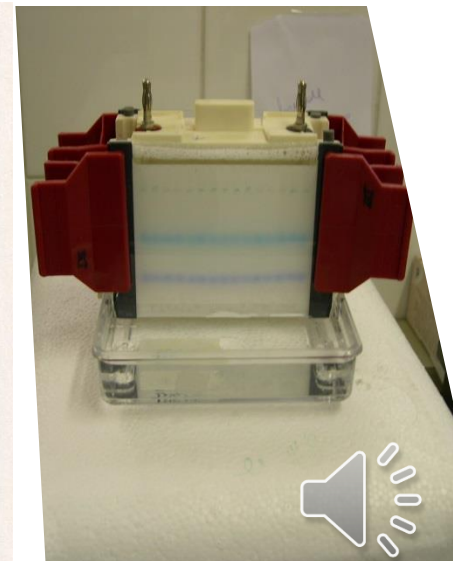
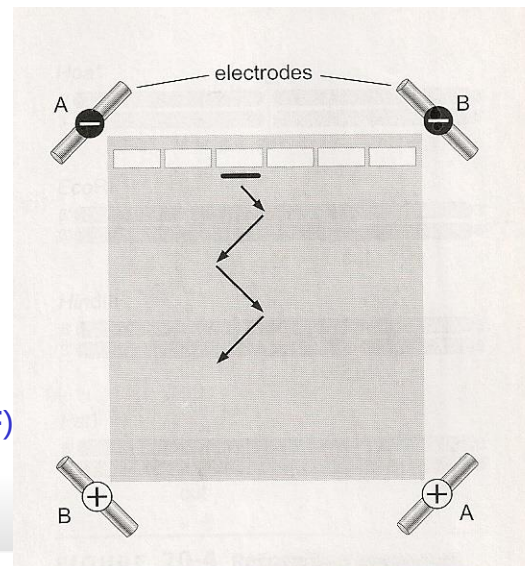
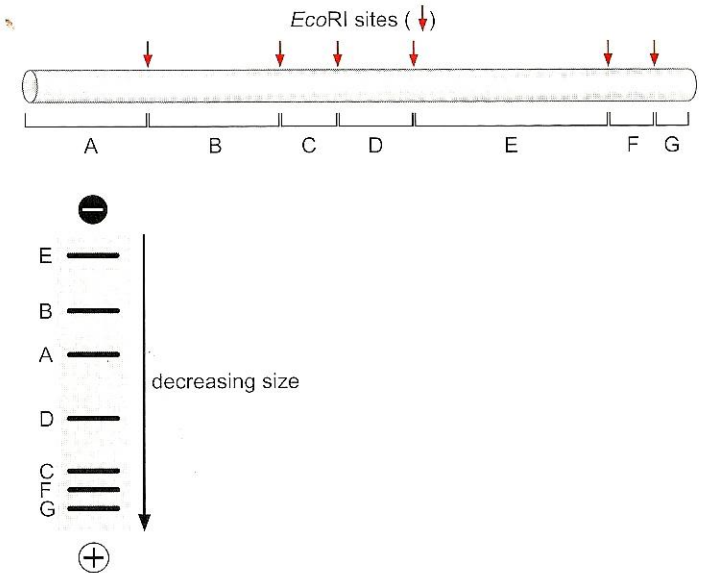
AGAROSE

POLIACRILAMIDA → > poder de resolução

PULSED – FIELD agarose Gel (CHEF)

Moléculas Longas (cromossomos)

Clamped Homogeneous Electrical Field



Gel de Agarose

Separação de moléculas de DNA e RNA por tamanho

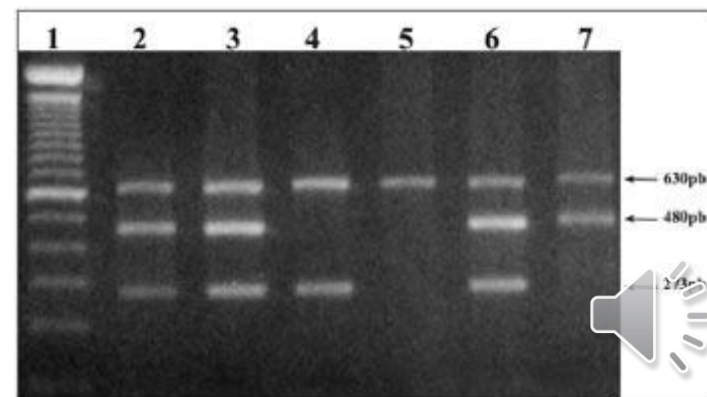
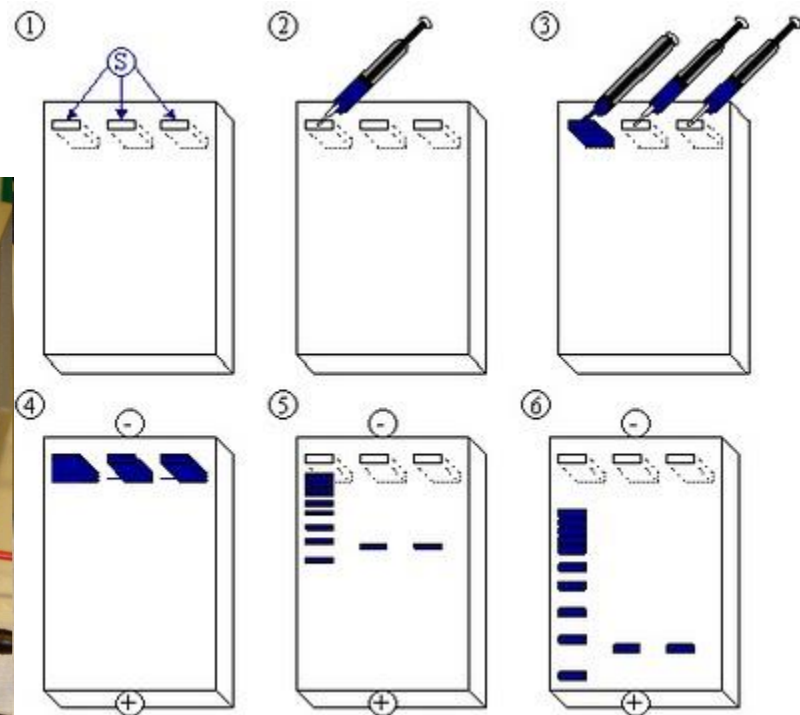
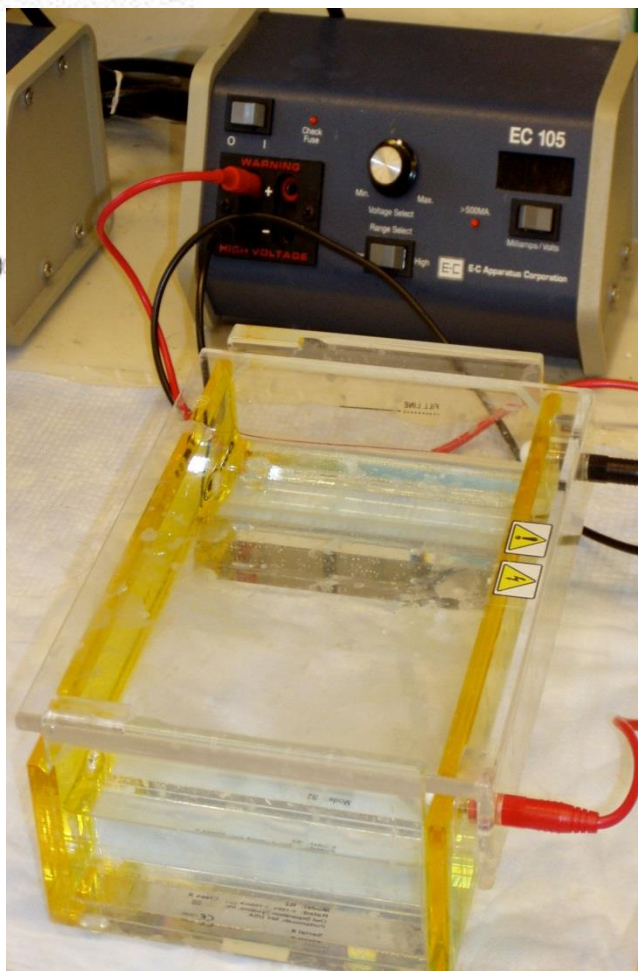


Mistura de macromoléculas



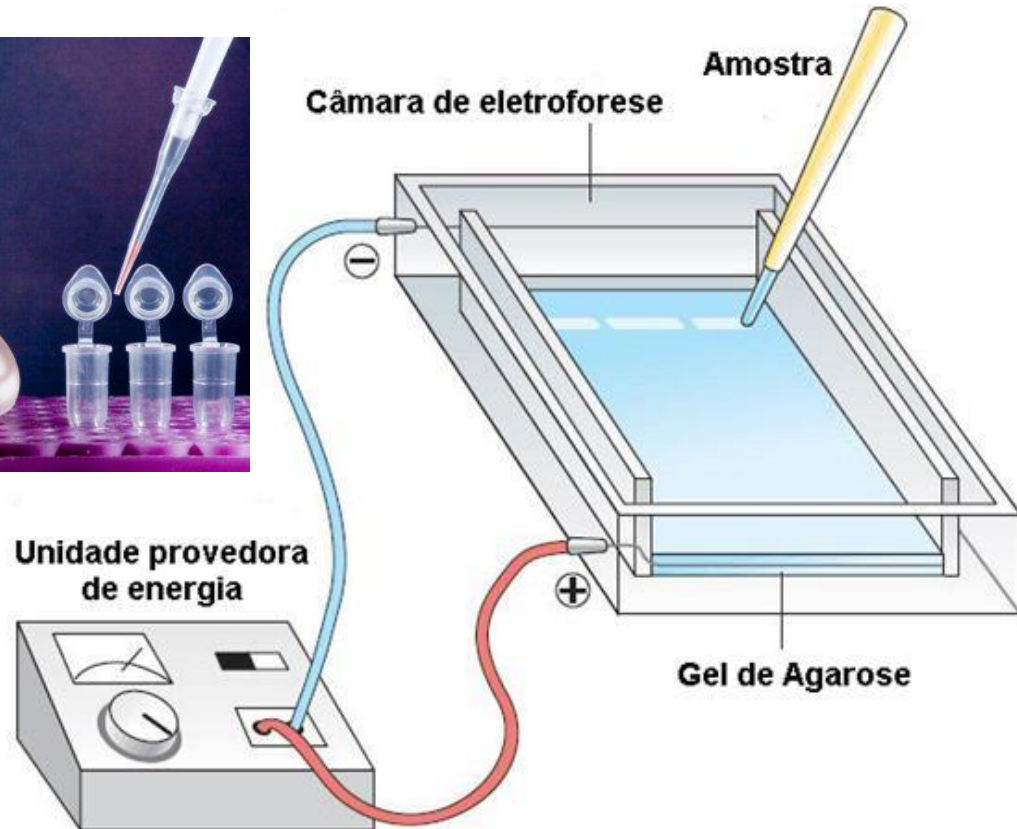
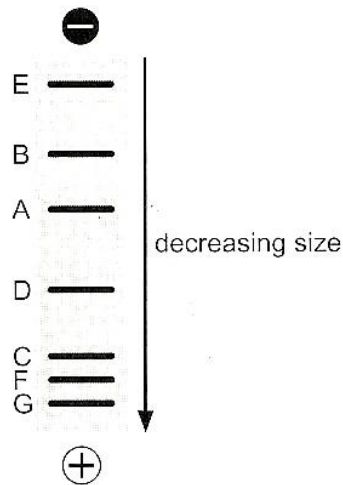
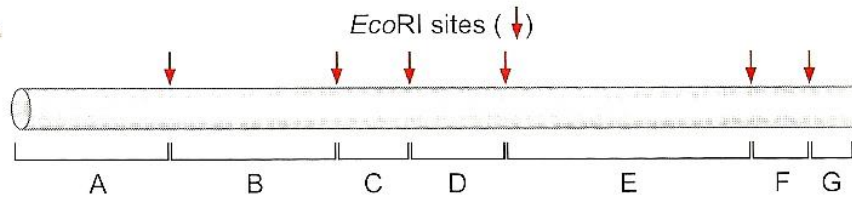
Poros

Eletrforese



Padrão de Digestão : RFLP

Restricted
Fragment
Length
Polymorphism

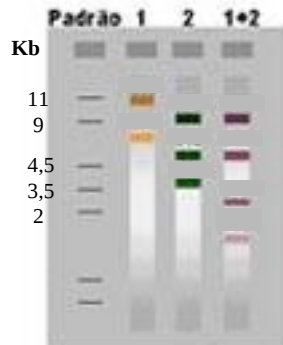


Padrão de Digestão : RFLP

Restricted
Fragment

Length

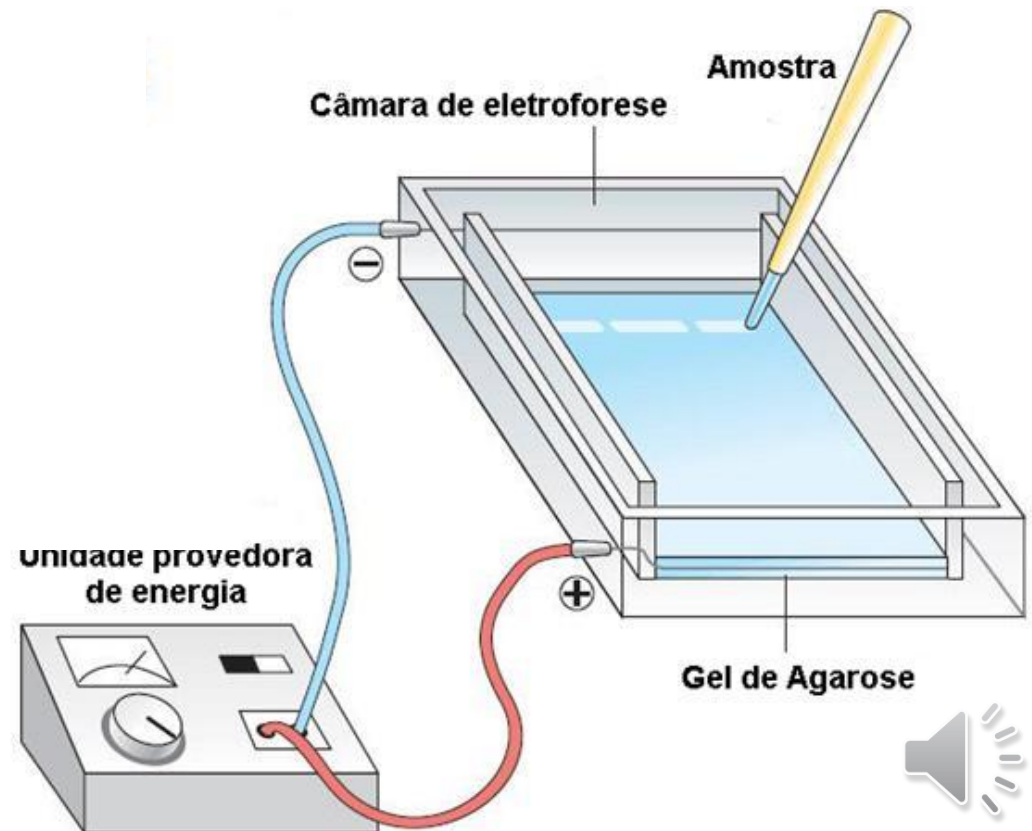
Polymorphism



Mapa genômico –
Sequência de nucleotídeos

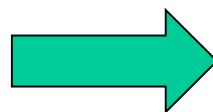
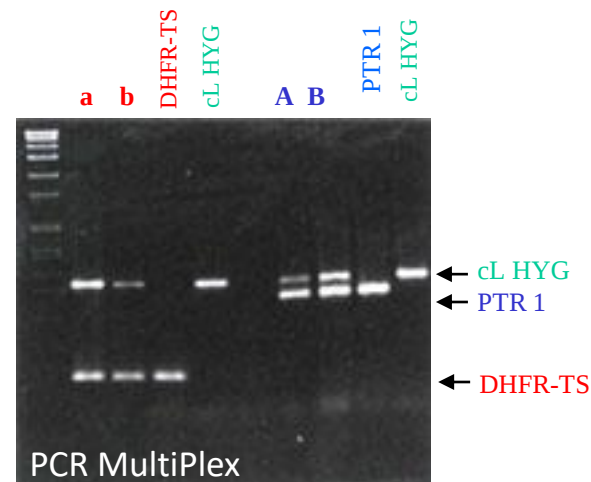
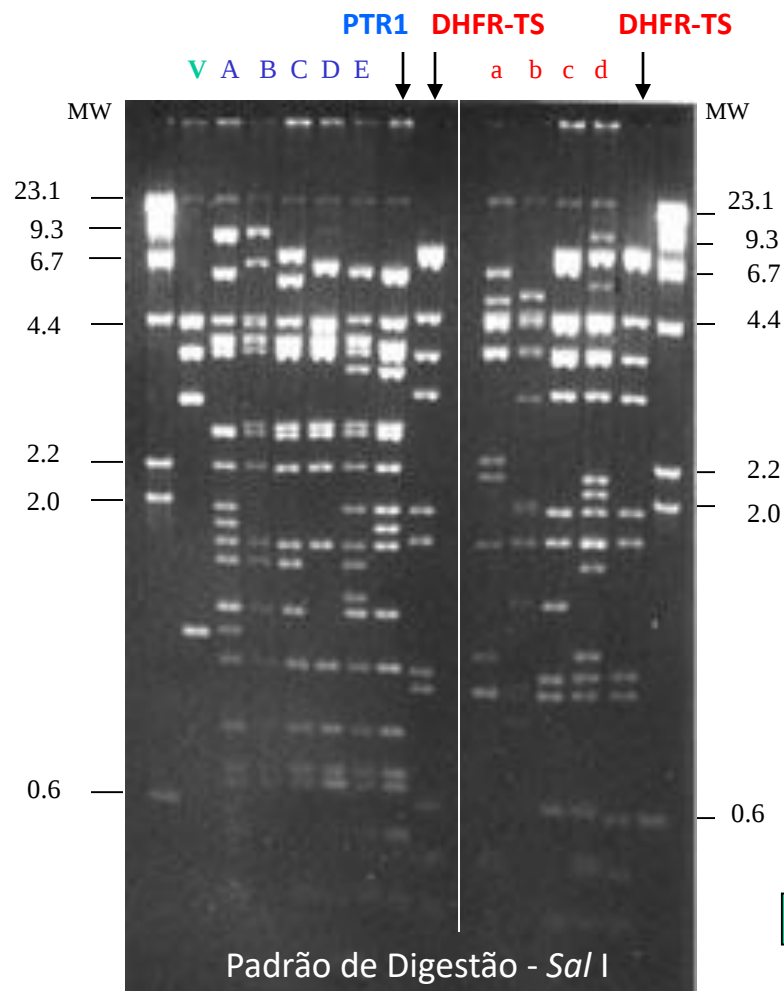
Enzima 1

Enzima 2



[illegible]

Análise de clones de Leishmania isolados a partir da seleção com MTX

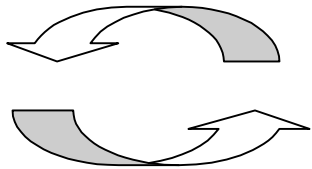


MAPA GENÉTICO



E pra que tudo isso ?????

GENE



PROTEÍNA



Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR :

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :



Sequência de Nucleotídeos : Genotipagem

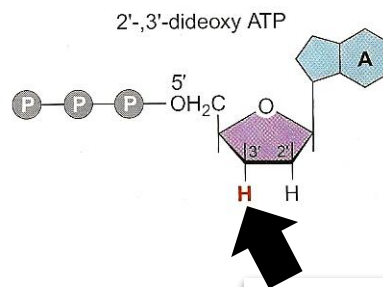
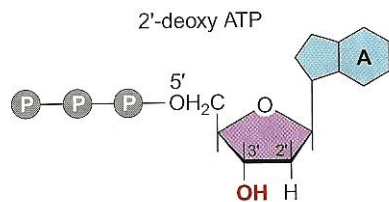
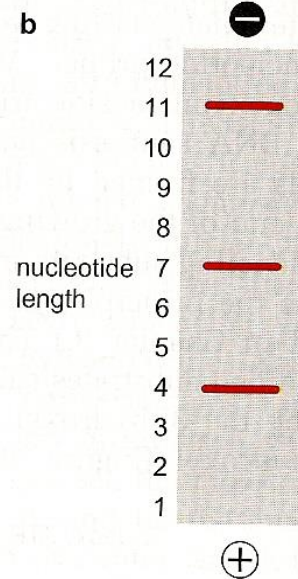
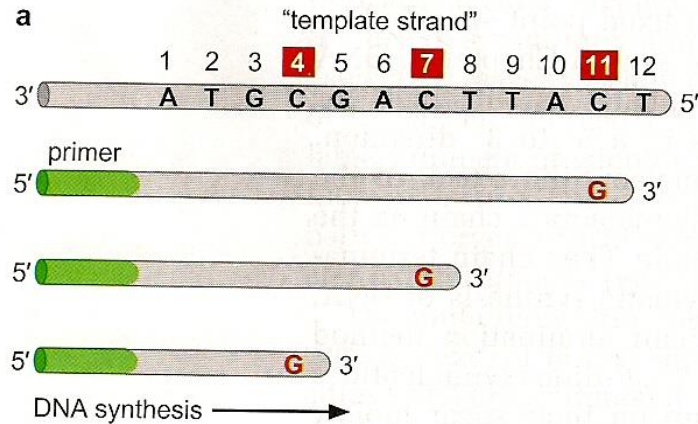
- A genotipagem é o processo pelo qual identificamos cada polimorfismo de interesse para um determinado número de animais, espécies, cepas, etc.
- Permite saber se uma espécie tem um maior grau de resistência, ou propensão a manifestar uma determinada característica.



‘fingerprint’ – impressão digital



Sequenciamento de nucleotídeos

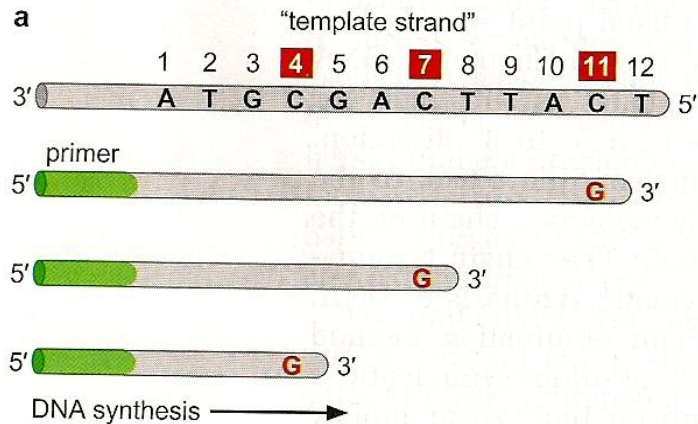


DIDEOXINUCLEOTÍDEO

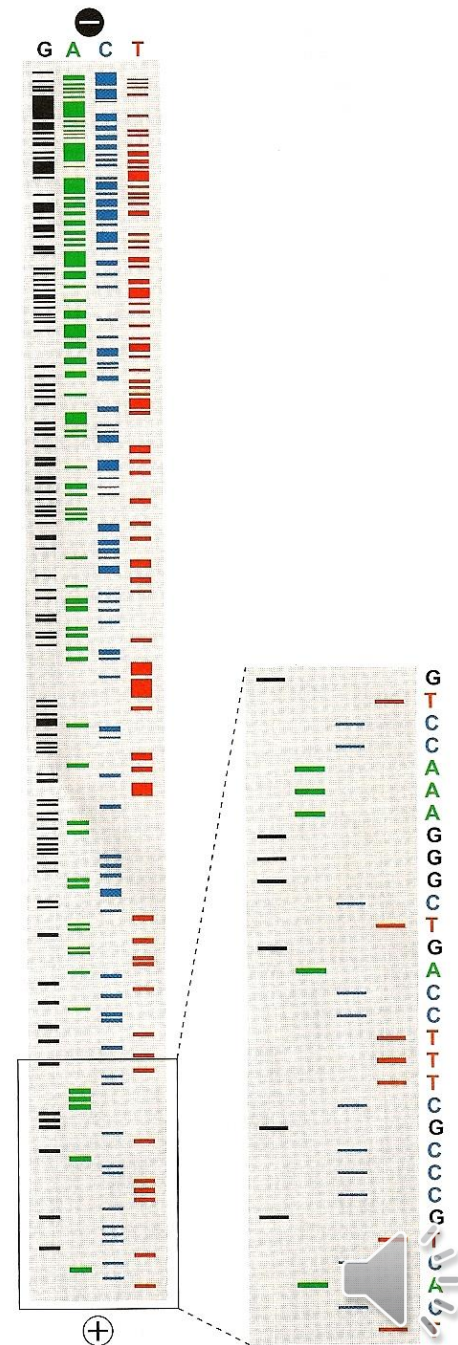
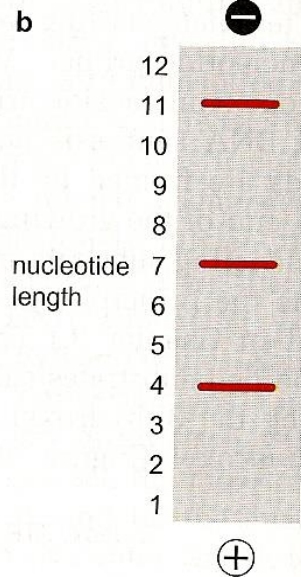
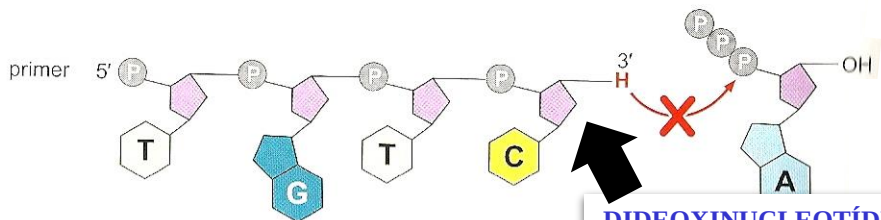
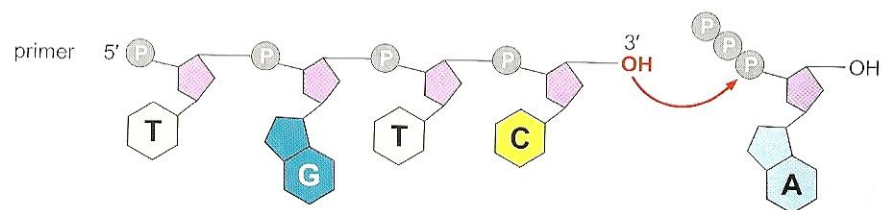


Frederick Sanger PNQ 58 e 80

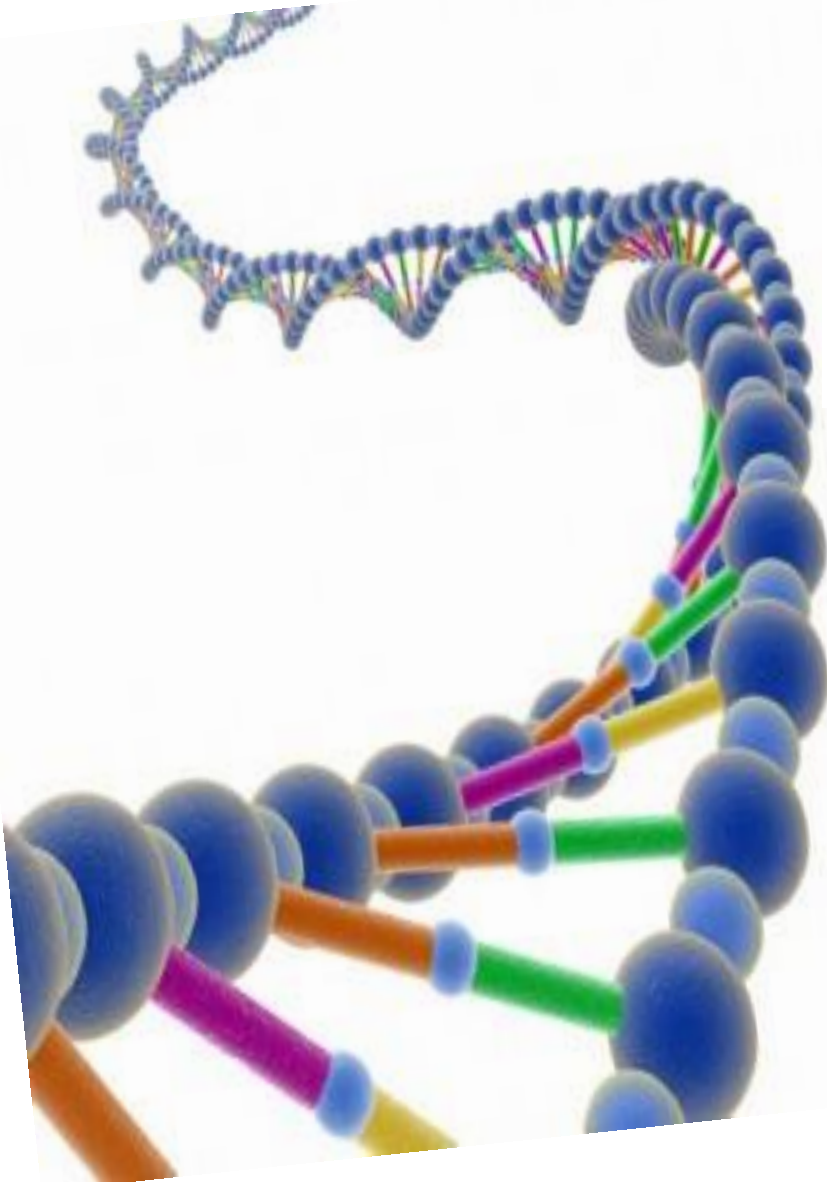
Sequenciamento de nucleotídeos



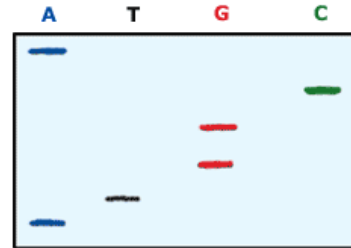
1 ddGTP : 100 dGTP



Sequência de Nucleotídeos : Genotipagem

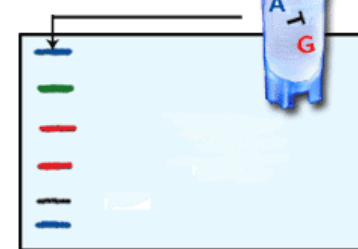


4a



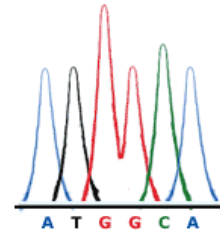
Análise dos produtos fluorescentes de sequenciamento em canais separados do gel de poliácridamida.

4b

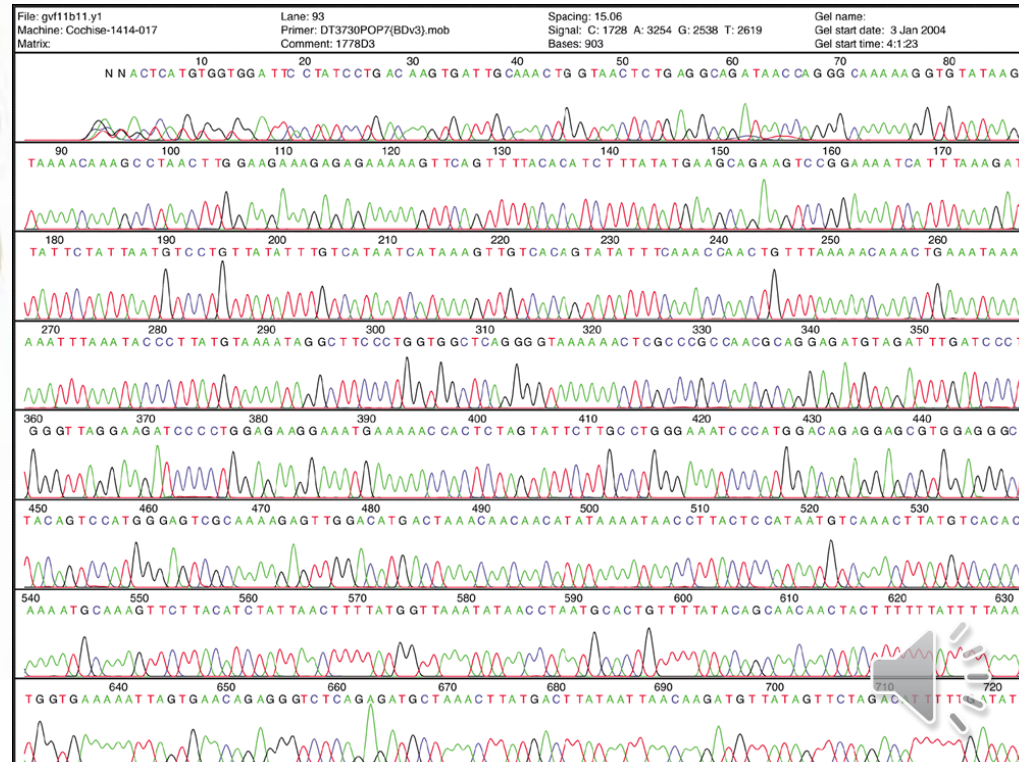


Análise dos produtos fluorescentes de sequenciamento em um único canal do gel de poliácridamida.

4c



Eletroforegrama do gel



Comparação das sequências de nucleotídeos da mesma proteína em 3 diferentes espécies

	Start
Human	GTTTGTGAGG - - - ATGTTCAACAAATGCTCCTTTTCATTCCTCTATTTACAGACCTGCCGCA
Chimpanzee	GTTTGTGAGG - - - ATGTTCAATAAATGCTGCTTTTCACTCCTCTATTTACAGACCTGCCGCA
Macaque	GTTTGTGAGG - - - ATGCTCAATAAATGCTCCTTTTCATTCCTCCATTTTACAAACTTGCCGCA
Human	GACAATTCTGCTAGCAGCCTTTGTGCTATTATCTGTTTTCTAAACTTAGTAATTGAGTGT
Chimpanzee	GACAATTCTGCTAGCAGCCTTTGTGCTATTATCTGTTTTCTAAACTTAGTAATTGAGTGT
Macaque	GACAATTCTGCTAGCAGCCTTTGTGCTATTATCTGTTTTCTAAACTTAGTAATTGAGTGT
Human	GATCTGGAGACTAA - CTCTGAAATAAATAAGCTGATTATTTATTTATTTTCTCAAAACAA
Chimpanzee	GATCTGGAGACTAAACTCTGAAATAAATAAGCTGATTATTTATTTATTTTCTCAAAACAA
Macaque	TATCTGGAGACTAAACTCTGAAATAAATAAGCTGATTATTTATTTATTTTCTCAAAACAA
Human	CAGAATACGATTTAGCAAATTACTTCTTAAGATATTATTTTACATTTCTATATTCTCCTA
Chimpanzee	CAGAATACGATTTAGCAAATTACTTCTTAAGATACATTTTACATTTCTATATTCTCCTA
Macaque	CAGAATATGATTTAGCAAATTACCCTCTTAAGATATTATTTTGCACCTTCTATATTCTCCTA
Human	CCCTGAGTTGATGTGTGAGCAATATGTCACCTTTCATAAAGCCAGGTATACA - - - TTATG
Chimpanzee	CCCTGAGTTGATGTGTGAGCCGTATGTCACCTTTCATAAAGCCAGGTATACA - - - TTATG
Macaque	CCCTGAGTTGATGTGTGAGCAATATGTCACCTTCCACAAGCCAGGTATATATACATTACG
	H I I Y S T F L S K
Human	GACAGGTAAGTAAAAAACATATTATTTATTCTACGTTTTTGTCCA AAAAATTTTAAATTTT
Chimpanzee	GACAGGTAAGTAAAAAACATATTATTTATTCTACGTTTTTGTCCAAGAATTTTAAATTTT
Macaque	GACAGGTAAGTAAAAA - CATATTATTTATTCTAGGTTTTTGTCCAAGAGTTTTTAAATTTT
Human	AACTGTTGCGCGTGTGTTGGTAA - - - TGTA AAACAAACTCAGTACA
Chimpanzee	AACTGTTGCGCGTGTGTTGGTAA - - - TGTA AAACAAACTCAGTACA
Macaque	AACTGTTGTGCAATGTGTTGGTAA - - - CGTA AAACAAATTCAGTACG



Comparação das sequências de aminoácidos da mesma proteína em diferentes de *Leishmania* spp.

PRP1

A			
La PRP1	LRGLTVVV	GATGSGKSVLLATLLGAFRFECHVGVARSVAYVPQPPWIMQATLEANITFFEGDRRGAAGCAANDGDSG-----	SAQAFS 84
Lb PRP1	LRGLTVVI	GATGSGKSVLLATLLGAFRFECHVSVASIAAYVPQPPWVMQETVEANITFFEGDRRGAPGGTAVGGGGSRAFKGD	SAQVFS 90
Li PRP1	PRAQLTVVV	GATGSGKSVLLATLLGAFRFECHVSVAKSVAYVPQPPWIMQETLEANITFFEGDRRGAAGCAAVDSN	SAQAFS 84
Lm PRP1	PRAQLTVVV	GATGSGKSVLLATLLGAFRFECHVDVARSVAYVPQPPWIMQETLEANITFFEGDRRRAAGGVADSDSG-----	SAQAFS 84
C			
B			
La PRP1	PLRCAEQAAAGAAVSRFCGCLG	TVSERLARAVRSCQLDQDVALMAGGLGTEIGERGINLSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDDPLSAL	174
Lb PRP1	PLRCATQAAAPGAASR-LAC	SRSLVSERLARAVRSCQLDADLALMAHGLHTEIGERGINLSGGQKARVSLARAVYADCDMYVLLDDPLSAL	179
Li PRP1	PLRCAEQAAAGAAVPRCFSC	GRDAAERLARAVRSCQLNADVALMARGLGTEIGERGINLSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDDPLSAL	174
Lm PRP1	PLRCAEQAAAGAAVSRFCGCG	CTVRERLARAVRSCQLDADVALMARGLGTEIGECGINLSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDDPLSAL	174
La PRP1	DVHVGRVMDEVVLR	ELAGKTRVLAT	200
Lb PRP1	DAHVGRRVMDEVVLR	LALAGKTRVLAT	205
Li PRP1	DAHVGRRVMDEVVLR	LALAGKTRVLAT	200
Lm PRP1	DVHVGRVMDEVVLR	LALAGKTRVLAT	200

MRPA (PGPA)

A			
La MRPA	PRAKLTVV	LQATGSGKSTLIQSLLSQFEISGRVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRGNILFFDEEDARLADAVRVSQLEADLAQLGGGLE 90
Lb MRPA	PRARLTVV	LQATGSGKSTLIQALLSQFEISKGRVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRGNILFFDEEDARLADAVRVSQLEADVALGGGLE 90
Li MRPA	PQFKLTMI	VIGATGSGKSTLLGSLMGEYDQSGEVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRDNILFFDEERAADLQDVIRCCQLEADVAQLGGGLE 90
Lm MRPA	PQFKLTMI	VIGATGSGKSTLLGSLMGEYDQSGEVWAERSIAYVPQQA	WIMNATVRNLSLFFDEERAADLQDVIRCCQLEADLAQLGGGLE 90
Lc MRPA	LRGLTVVV	LPTGSGKSTLLDALIGALAVTRGRVACRSRVAYVPQPP	WTMNLTRDNVIFFGAPDAAAFERAVRSSLASDLALLADGAE 90
Lt MRPA	PKGKLTMI	VIGATGSGKSTLLGALMGEYSVESGELWAERSIAYVPQQA	WIMNATLRGNILFFDEERAEDLQDVIRCCQLEADLAQFCGGLD 90
Tb MRPA	PKGKLTVV	LQATGSGKSTLLETLLGNFEVTHGSVLAAKSFAYVPQPP	WIMNATLRDNILFFTPENEERLHKAVRVCQLEADLQQLPAGME 90
C			
B			
La MRPA	TEIGEGVNL	SSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDDPLSALDAHVGERVVEECFLGALAGKTRVLAT	156
Lb MRPA	TEIGEGVNL	SSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDDPLSALDAHVGERVMEECFLGALAGKTRVLPN	156
Li MRPA	TEIGEMVNL	SSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDDPLSALDAHVGRVQDVIRGRLHGKTRVLAT	156
Lm MRPA	TEIGEGVNL	SSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDDPLSALDAHVGRQIVQDVICGRLRGKTRVLAT	156
Lc MRPA	TEIGEMGINL	SSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDDPLSALDAQVGERVMRECVCGALAGKTRVLAT	156
Lt MRPA	TEIGEMVNL	SSGGQKARVSLARAVYANRDVYLLDDPLSALDAHVGRQIVQDVILGRLRGKTRVLAT	156
Tb MRPA	TEIGEGGINL	SSGGQKARVSLARAVYADRDVYLLDDPLSALDAHVGLIVRDLILGHLACKTRVLAT	156

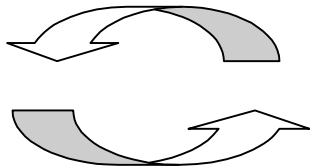


intervalo ?????



E pra que tudo isso ?????

GENE



PROTEÍNA



Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

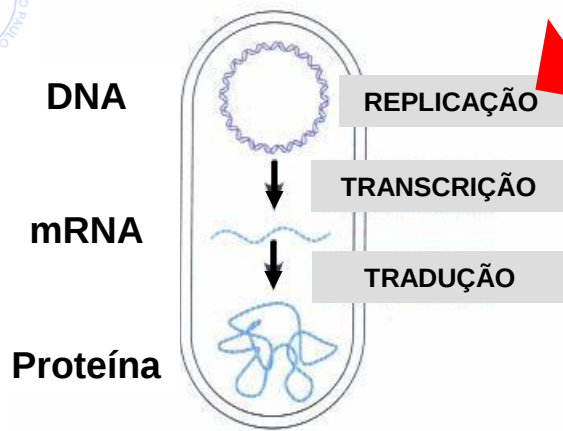
PCR :

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

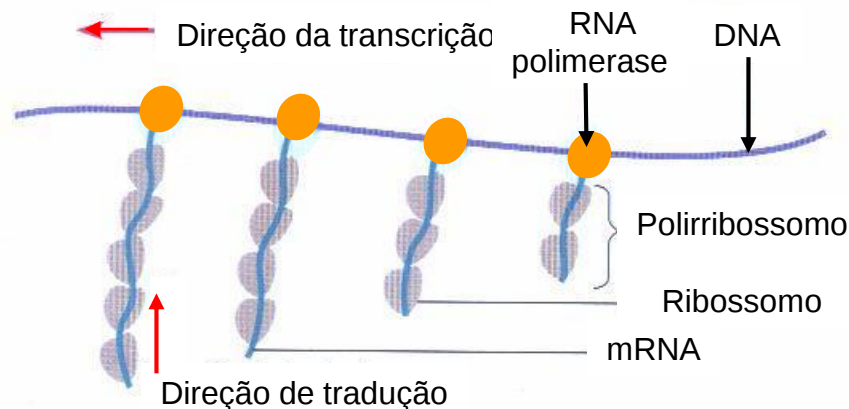
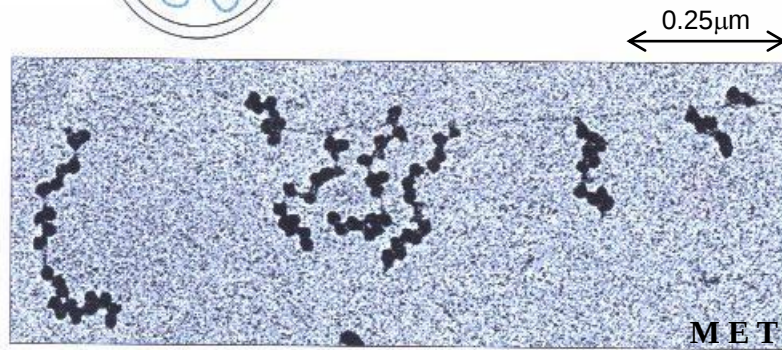
Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :





Conceitos básicos de genética clássica



O Dogma Central da Biologia Molecular

Proposto por sir Francis Crick em 1958 na tentativa de relacionar o DNA, o RNA e proteínas.

O DNA pode se replicar e dar origem a novas moléculas de DNA, pode ainda ser transcrito em RNA, e este por sua vez traduz o código genético em proteínas



Replicação do DNA

SEMI - CONSERVATIVA - $5' \rightarrow 3'$

NECESSITA :

INICIADOR

MODELO

NUCLEOTÍDEOS

ENZIMAS

helicase

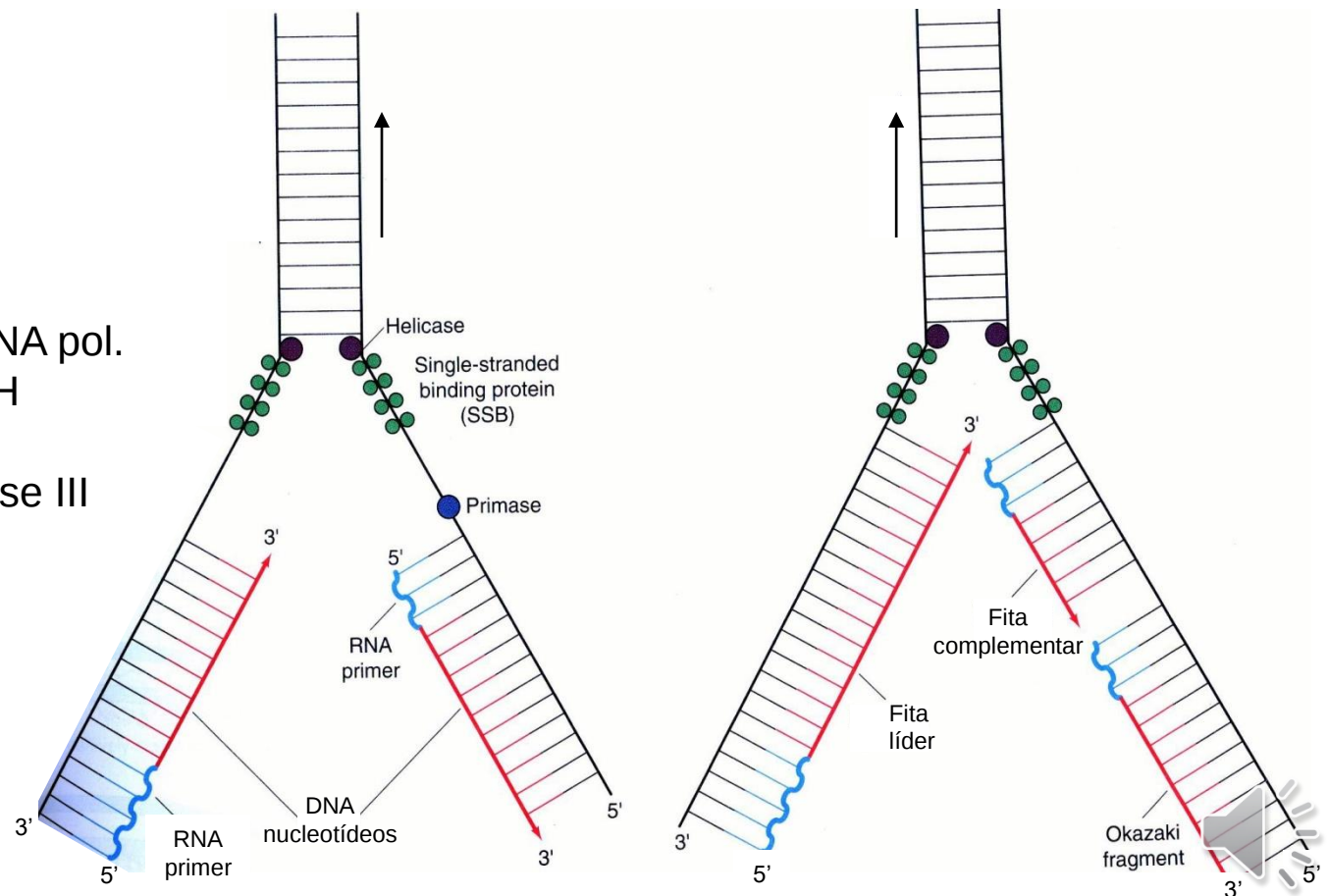
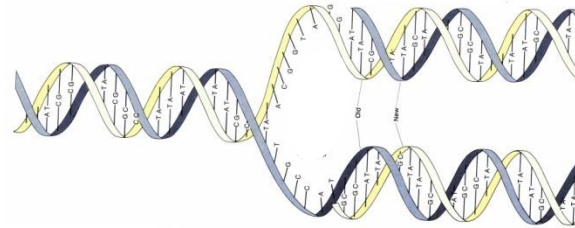
SSB

primase ou RNA pol.

ribonuclease H

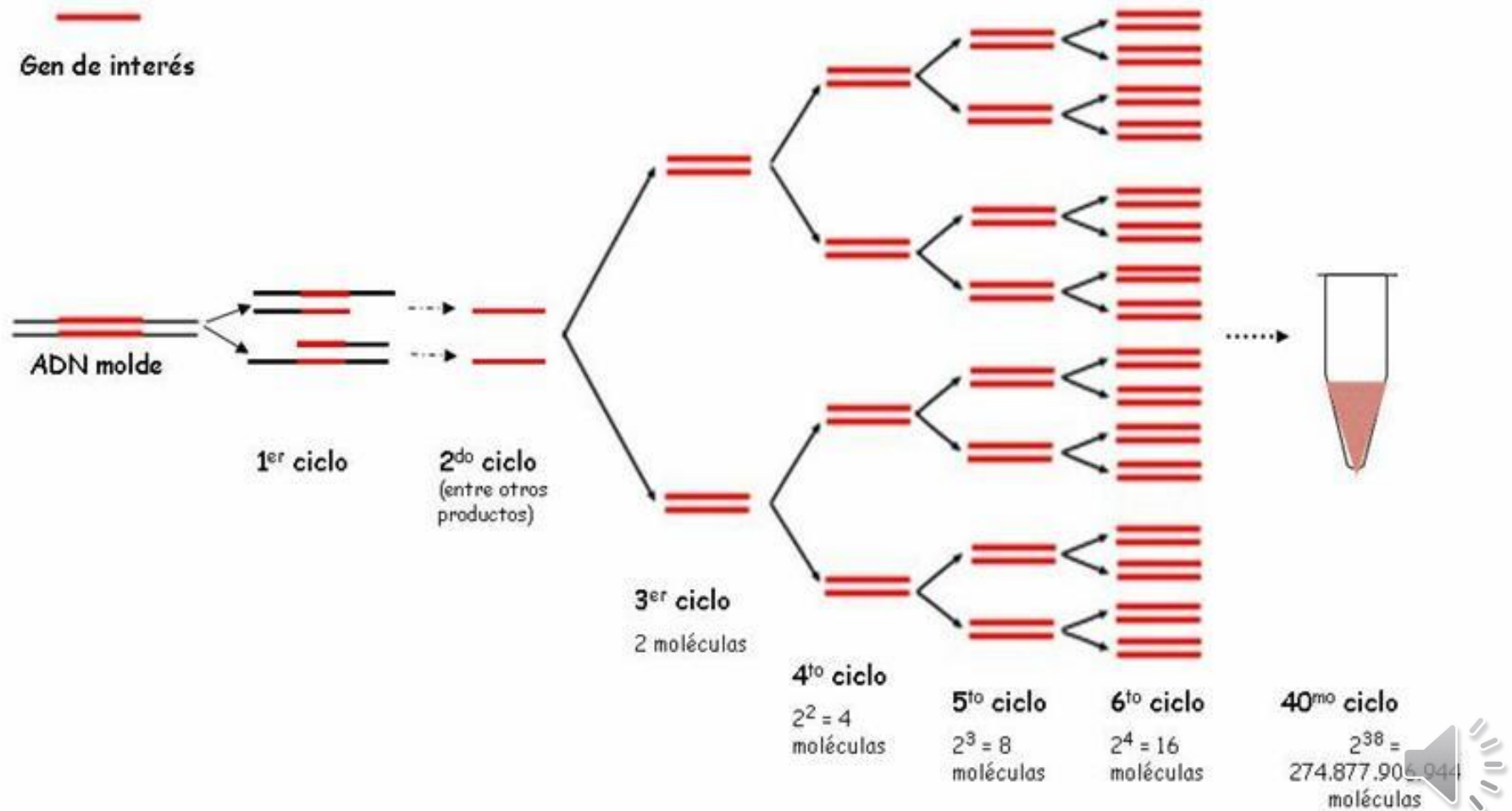
ligase

DNA polimerase III



PCR - Reação em cadeia da Polimerase

Polymerase
Chain
Reaction



Reação em cadeia da Polimerase

DNA original —

+ iniciadores —

+dNTPs —

+DNA Polimerase

Denaturação

e Síntese

Denaturação

e Síntese

Denaturação

e Síntese

Etc...



Kary B. Mullis PNQ 93

[PCRanimação](#)

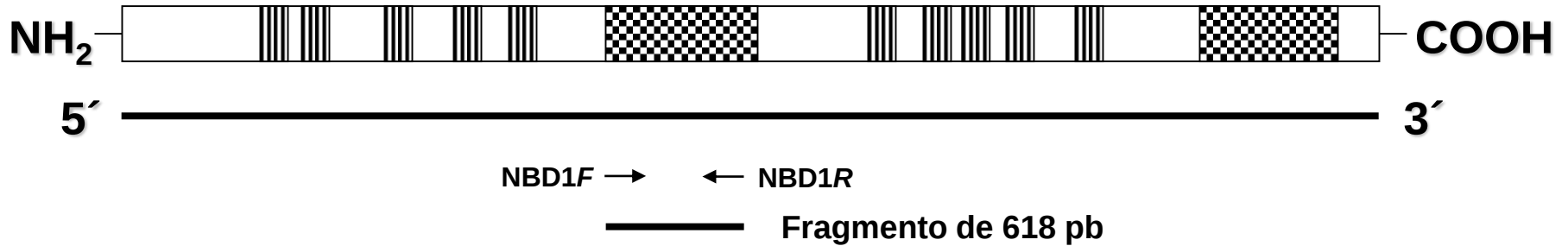
[reação em cadeia](#)

Etc....

Etc....



PCR - Reação em cadeia da Polimerase



Identificação de ortólogos do transportador
ABC PRP1 em *Leishmania* spp.

M - Lm La Lb Lc M

bp

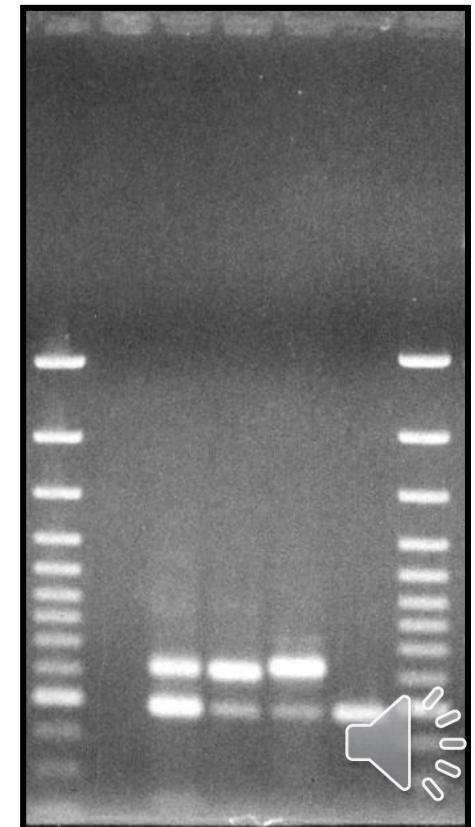
3000 —

2000 —

1000 —

600 —

500 —

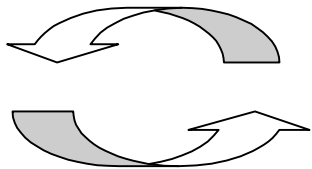


		A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

← NBD1R

E pra que tudo isso ?????

GENE



PROTEÍNA



Padrão de Digestão : RFLP

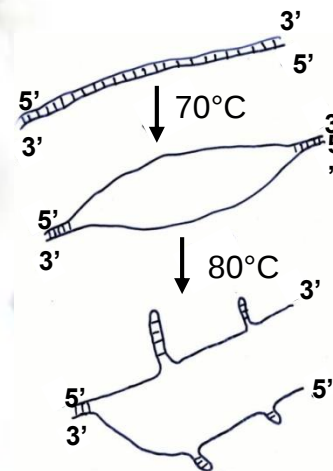
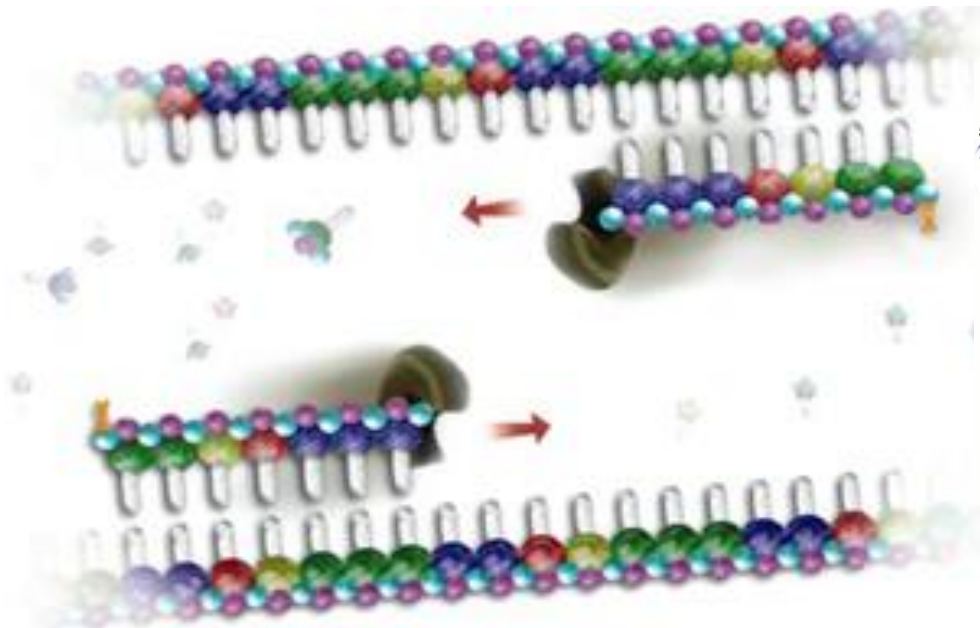
Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR :

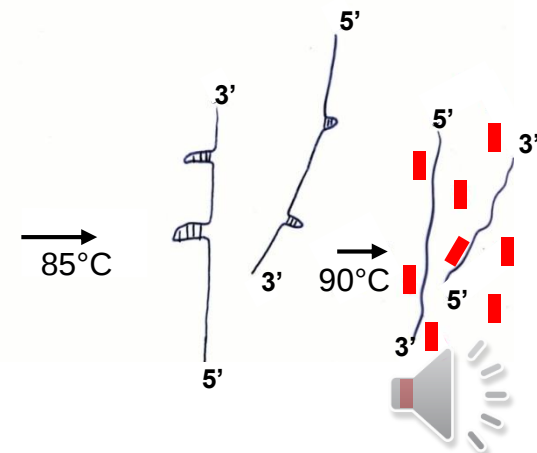
Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :



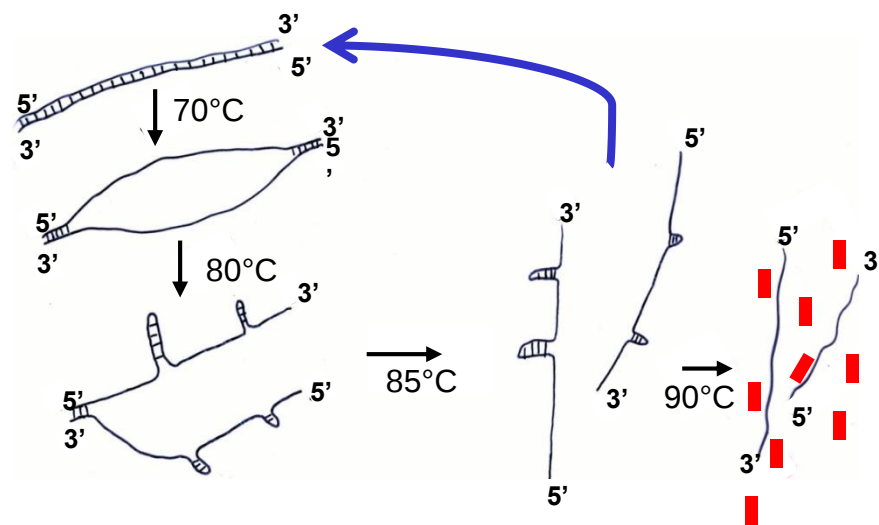
Identificar uma molécula específica de DNA



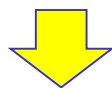
Hibridização de uma molécula específica de DNA

Propriedade físicas e químicas do DNA:

- Viscosidade
- Sedimentação em Gradiente de CsCl (+ CG, + denso)
- Denaturação: Química - $\text{pH} < 4$ ou > 11 (NaOH)
Física - T_m (proporcional ao CG)



Capacidade do DNA denaturado de reanelar



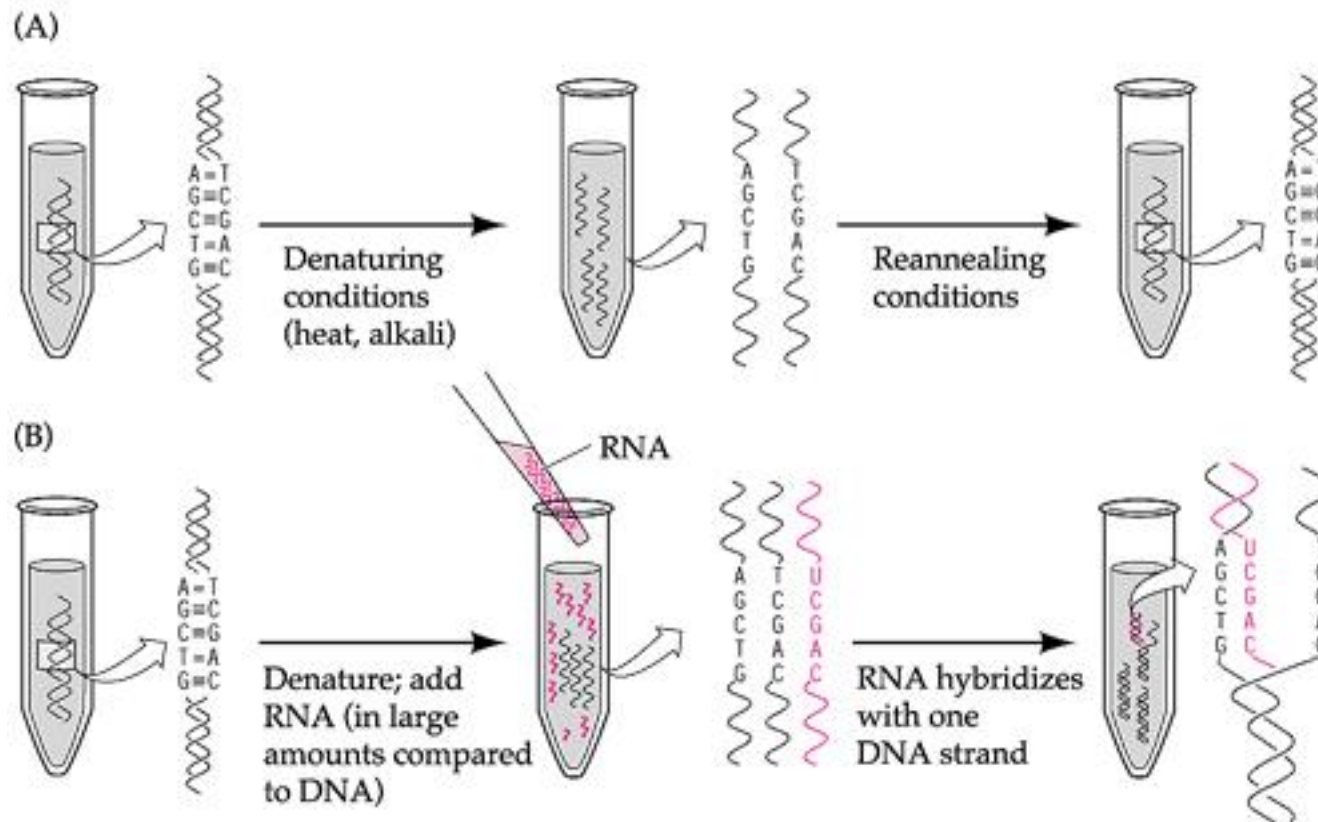
Formação de moléculas híbridas, quando DNAs homólogos e denaturados de duas fontes diferentes são colocados sob condições de temperatura e força iônica apropriadas

H
I
B
R
I
D
I
Z
A
Ç
Ã
O



Hibridização → identificando uma molécula específica de DNA

Hibridização é o processo de pareamento entre dois polinucleotídeos simples fita e complementares



SONDA

1. ser capaz de se ligar a uma molécula com seq. complementar

- frag/o. purificado sintético

2. estar marcada

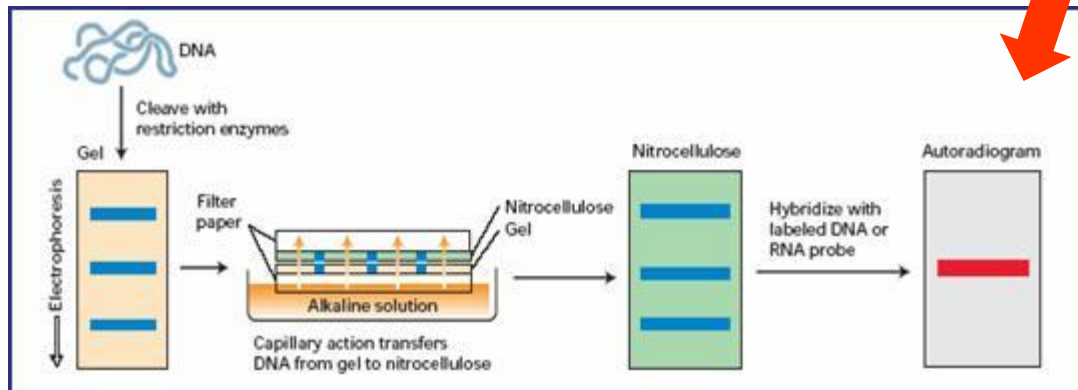
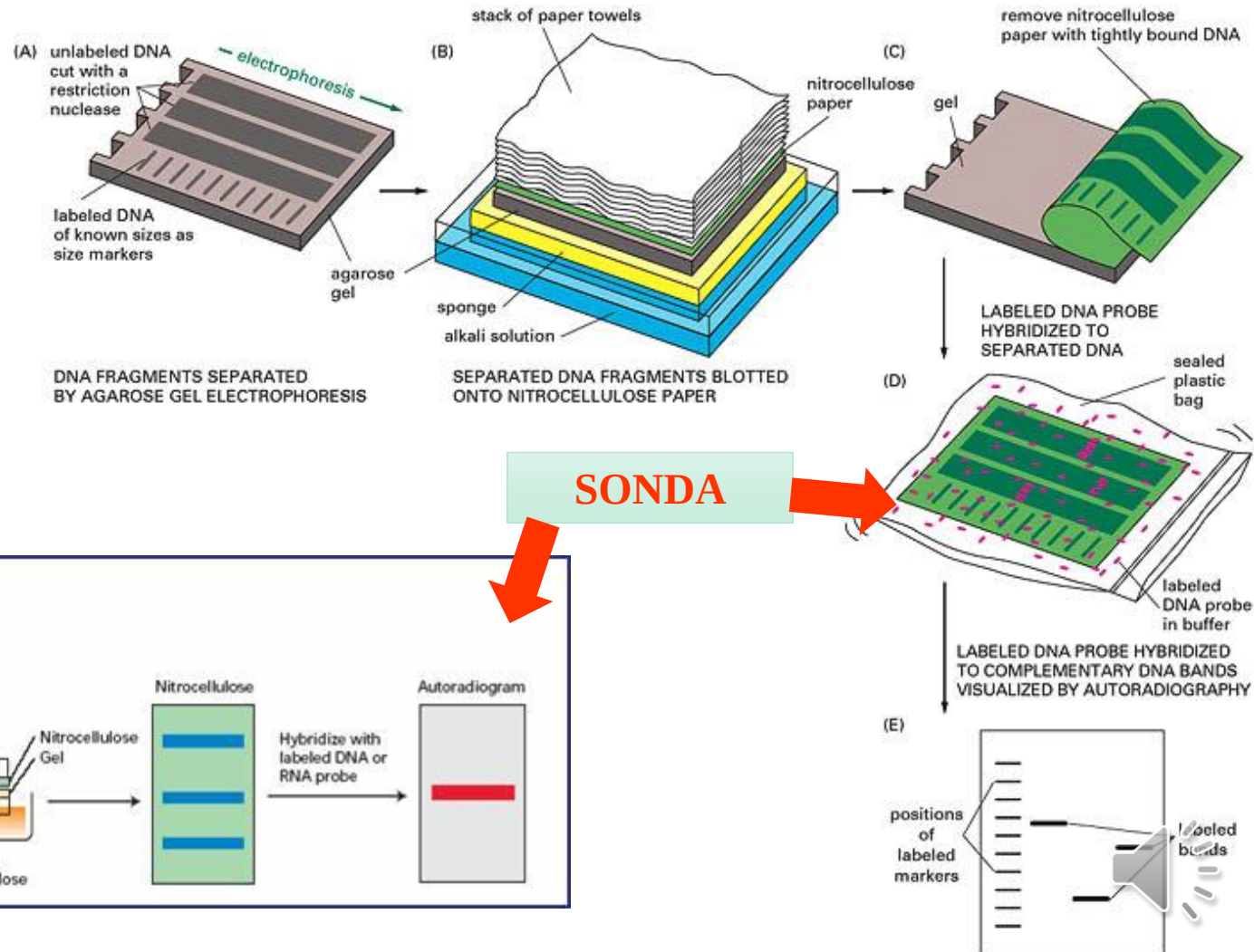
- p^{32}
- Fluorescência



Hibridização → southern - northern blot

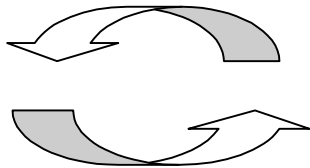
dna rna

Hibridização de uma molécula de ac nucleico livre em outra molécula aderida a um papel de filtro



E pra que tudo isso ?????

GENE



PROTEÍNA



Padrão de Digestão : RFLP

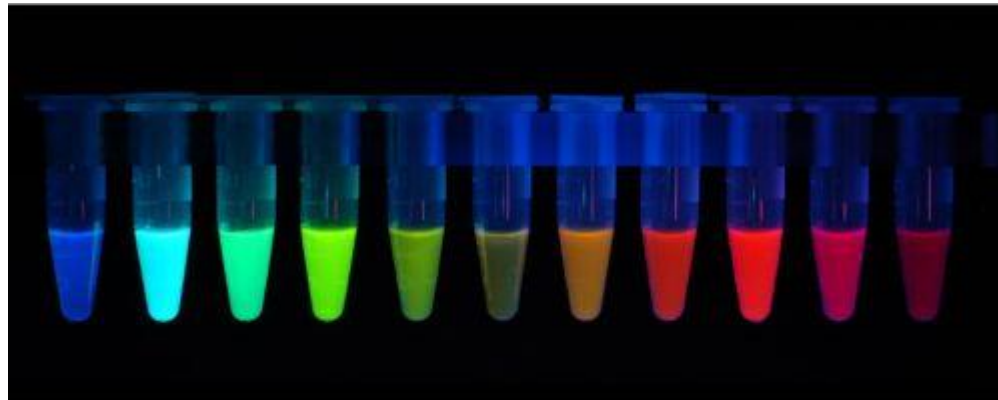
Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR :

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :



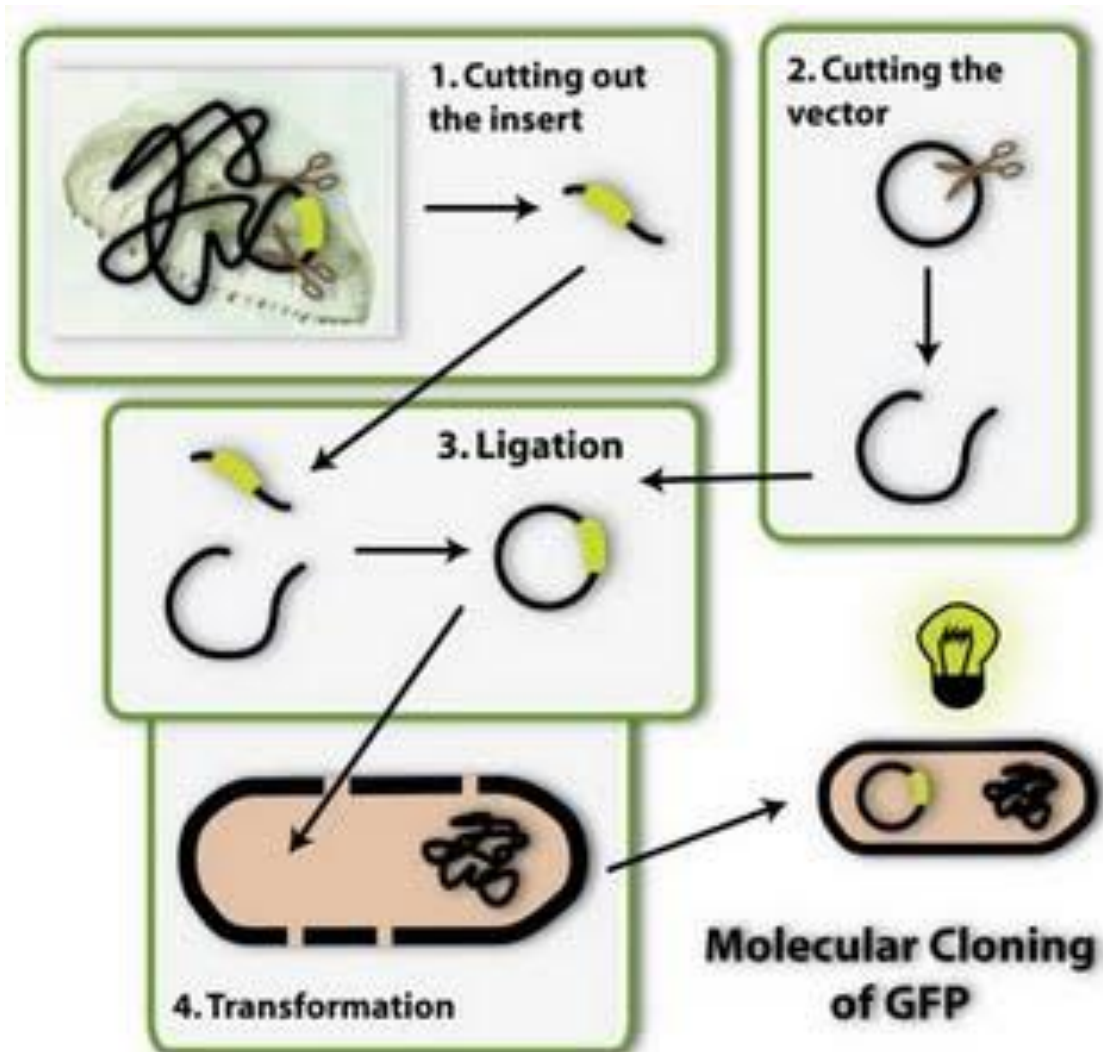


Métodos de clonagem molecular

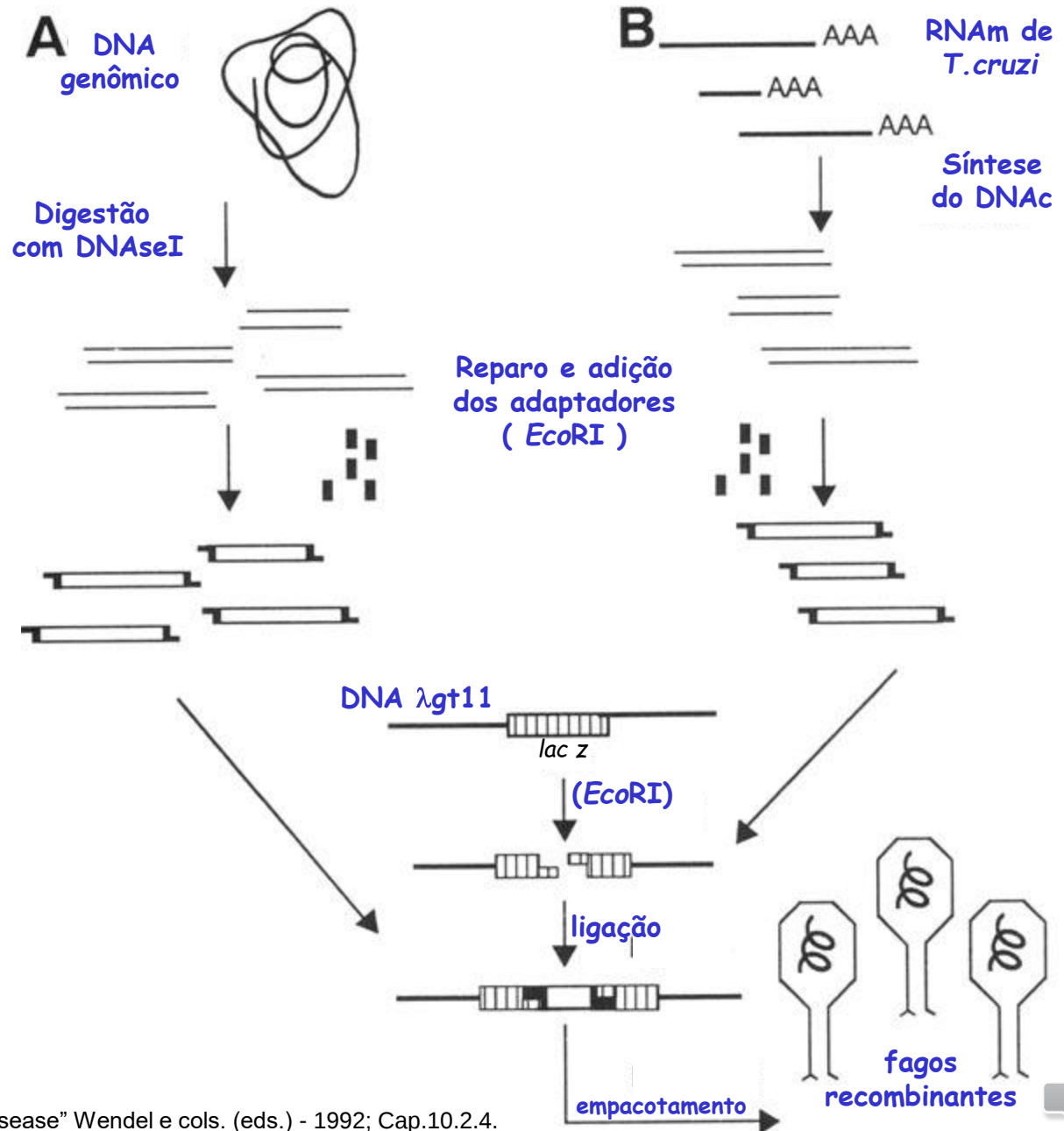
- 1 Tipos: **genômica** - enzimas de restrição, seringa, DNase
c-DNA - genes de uma fase evolutiva específica
- 2 Vetores: bacteriófagos, plasmídios, cosmídios, etc.
- 3 Construção Genoteca - vetores de substituição,
inserção,
expressão.
- 4 Seleção dos Clones : P^{32} (**radioativo**),
XGal + IPTG (**químico**),
AC (**imunológico**)



Etapas na construção de uma Genoteca

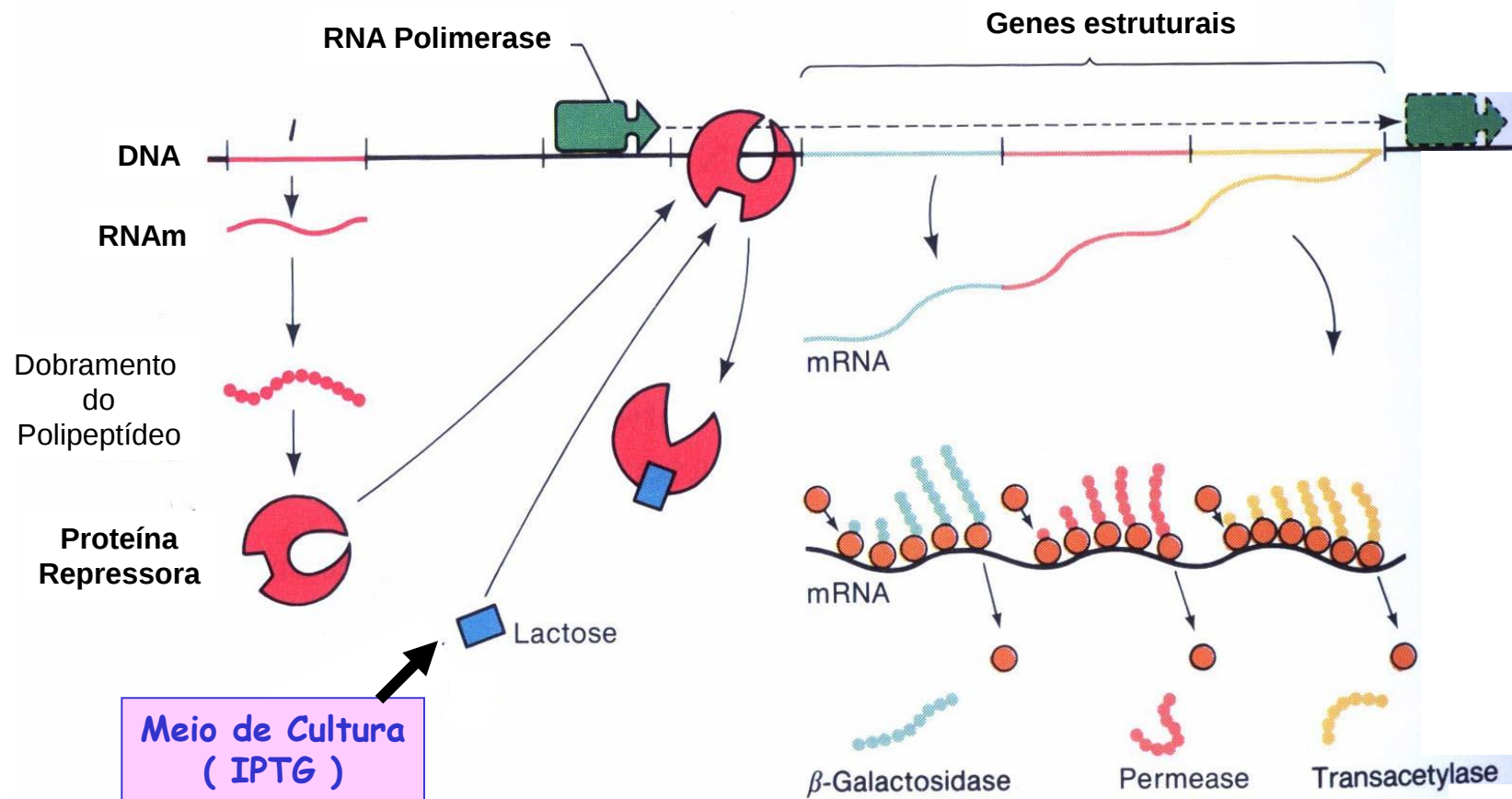


Construção de uma genoteca de expressão (genômica ou de c-DNA)

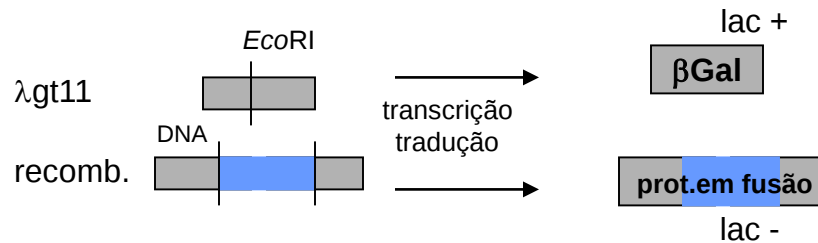


Regulação da Expressão Gênica

Regulação do operon da lactose (operon *lac*)

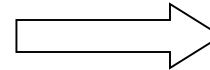


Seleção Química de clones recombinantes

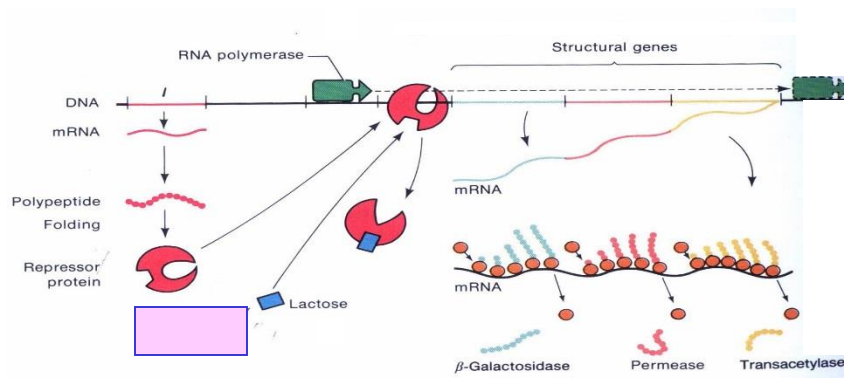


ATIVIDADE ENZIMÁTICA

X-Gal



SEM ATIVIDADE ENZIMÁTICA

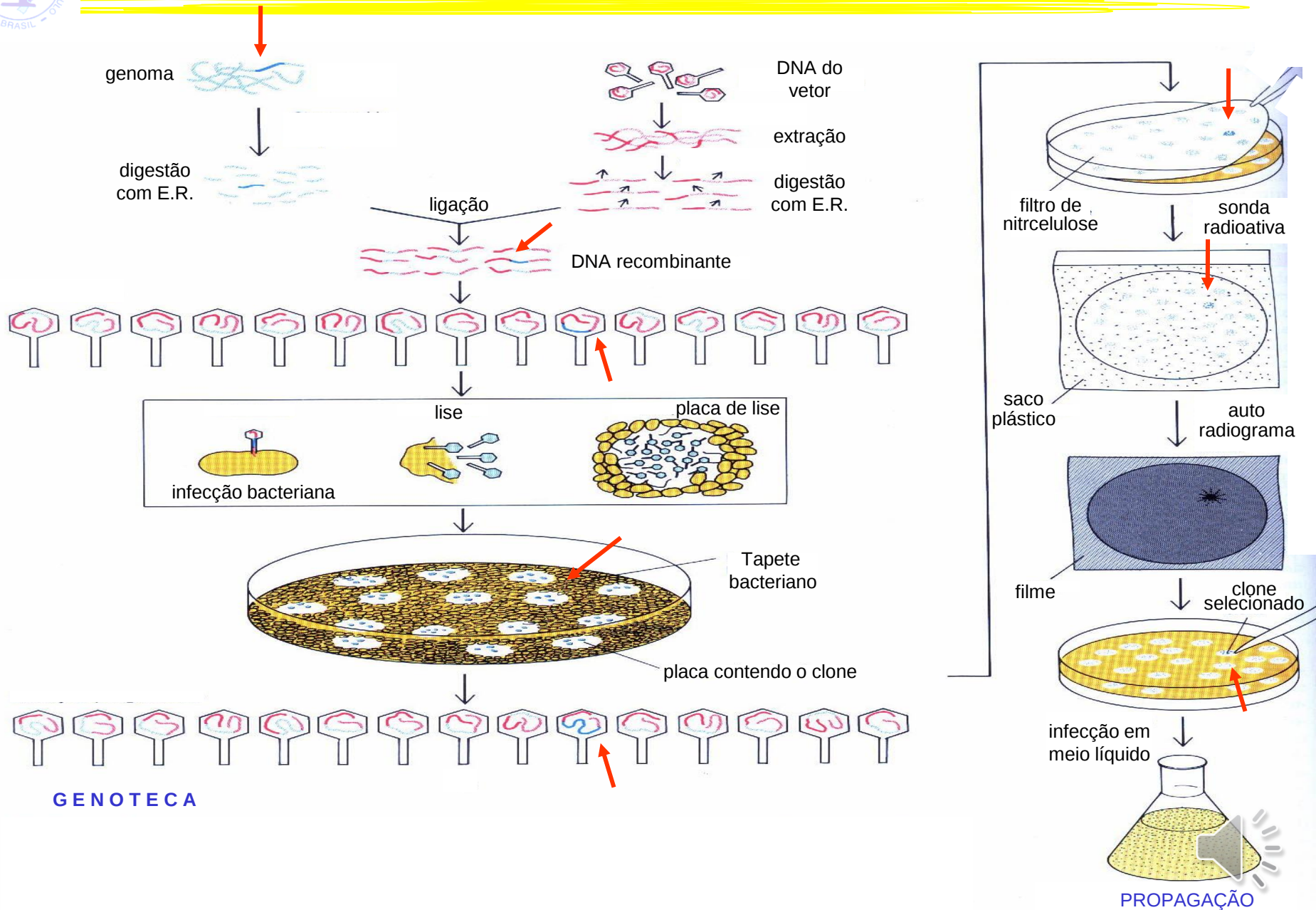


IPTG + X-Gal

Produto azul

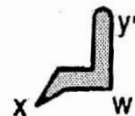
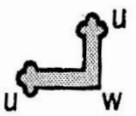


Seleção de clones recombinantes



Seleção Imunológica de clones recombinantes

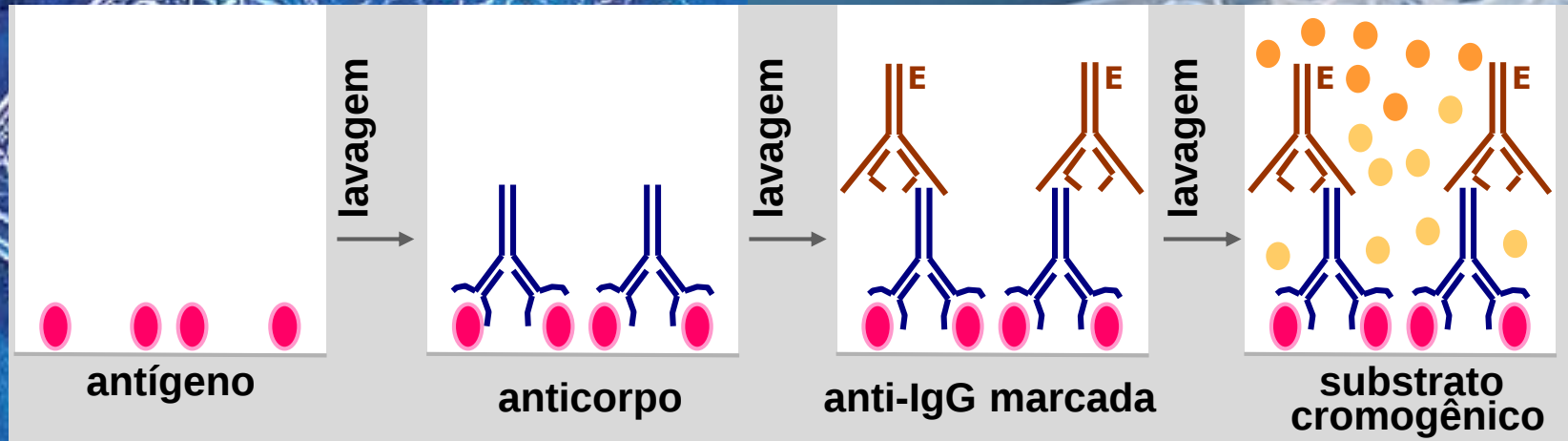


Antígeno			
Soro			
Reações			
	Específica	Cruzada	(Sem Reação)



Imunoseleção de fagos recombinantes

teste imunoenzimático - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)



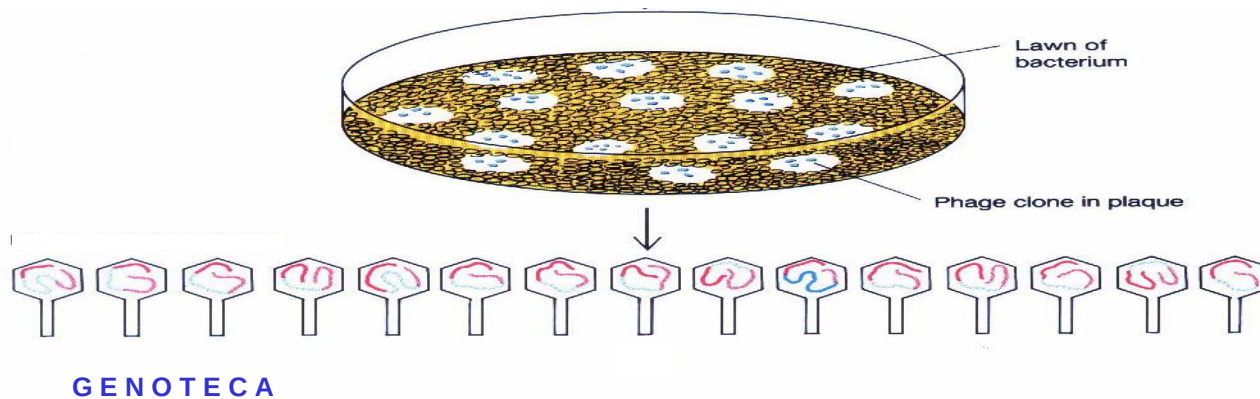
Reação Primária -- ligação dos grupos reativos da molécula antigênica com um dos dois sítios de combinação da molécula de anticorpo.

Reação Secundária -- visualização direta ou com auxílio de lupas da precipitação ou da aglutinação.

Reação Terciária -- expressão biológica da interação Ag-AC.

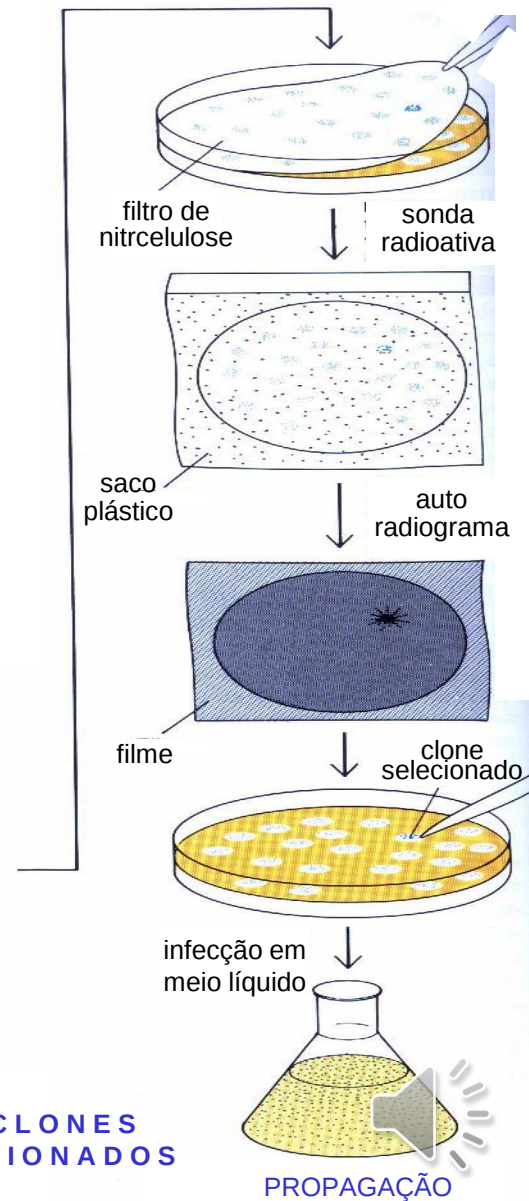


Seleção de clones recombinantes com soro de pacientes chagásicos

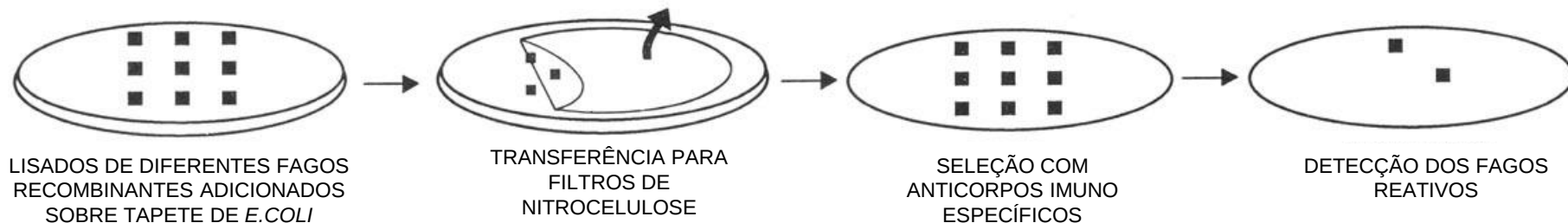


GENOTECA

11 CLONES
SELECIONADOS

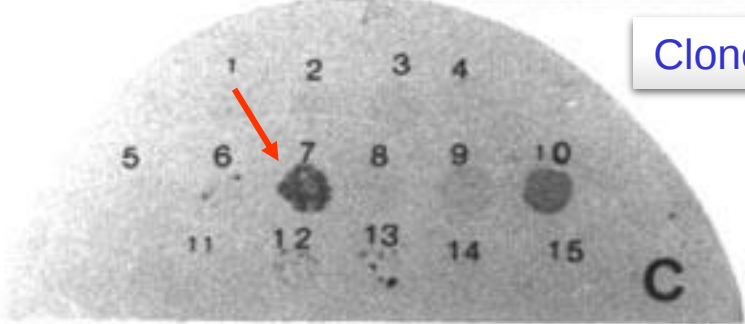
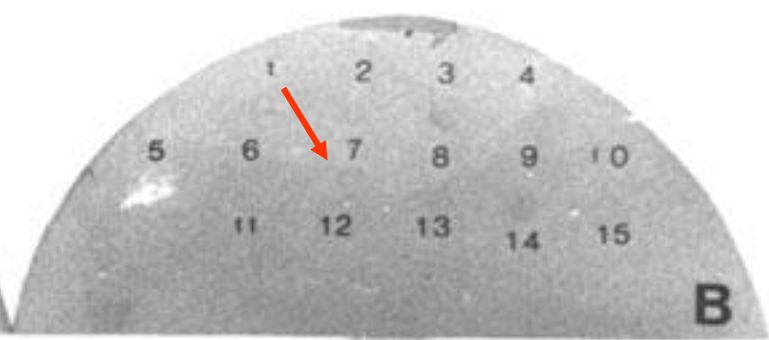
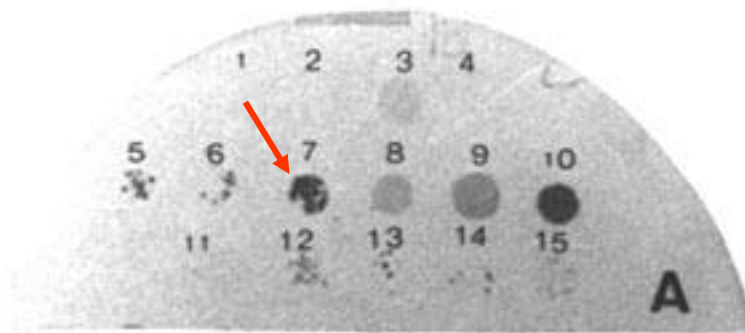


Imunoseleção de fagos recombinantes

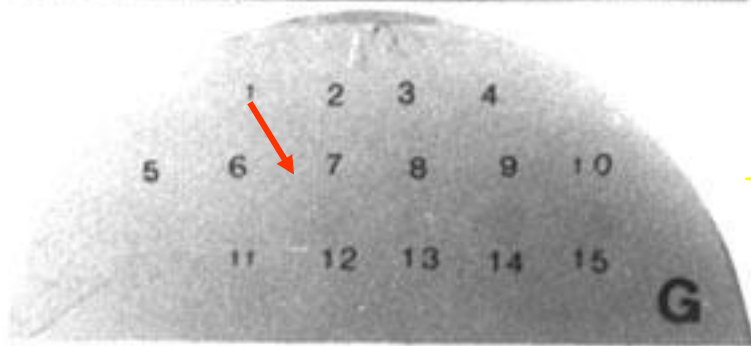
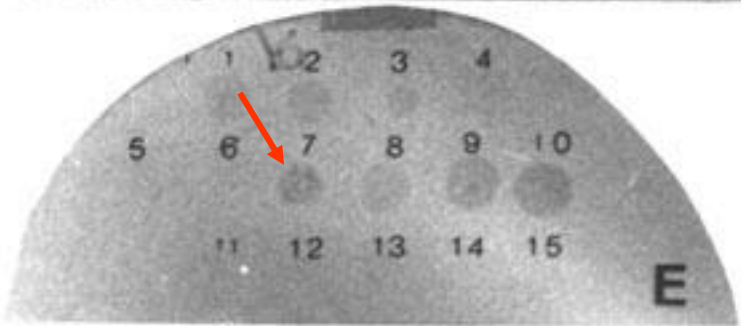
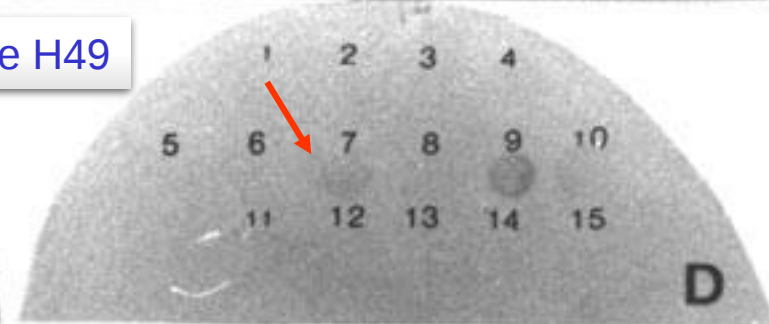


Imuno análise por dot blot





Clone H49



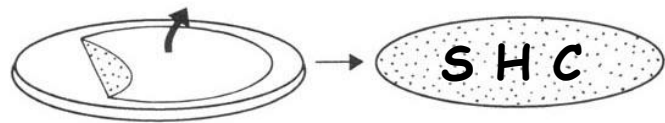
Reatividade de clones expressores com pool de soros de pacientes com diferentes parasitoses

- A - Chagásicos
- B - Leishm. Cutânea
- C - Leishm. Visceral

- D - Toxoplasmose
- E - Esquistossomose
- F - Malária
- G - Normais

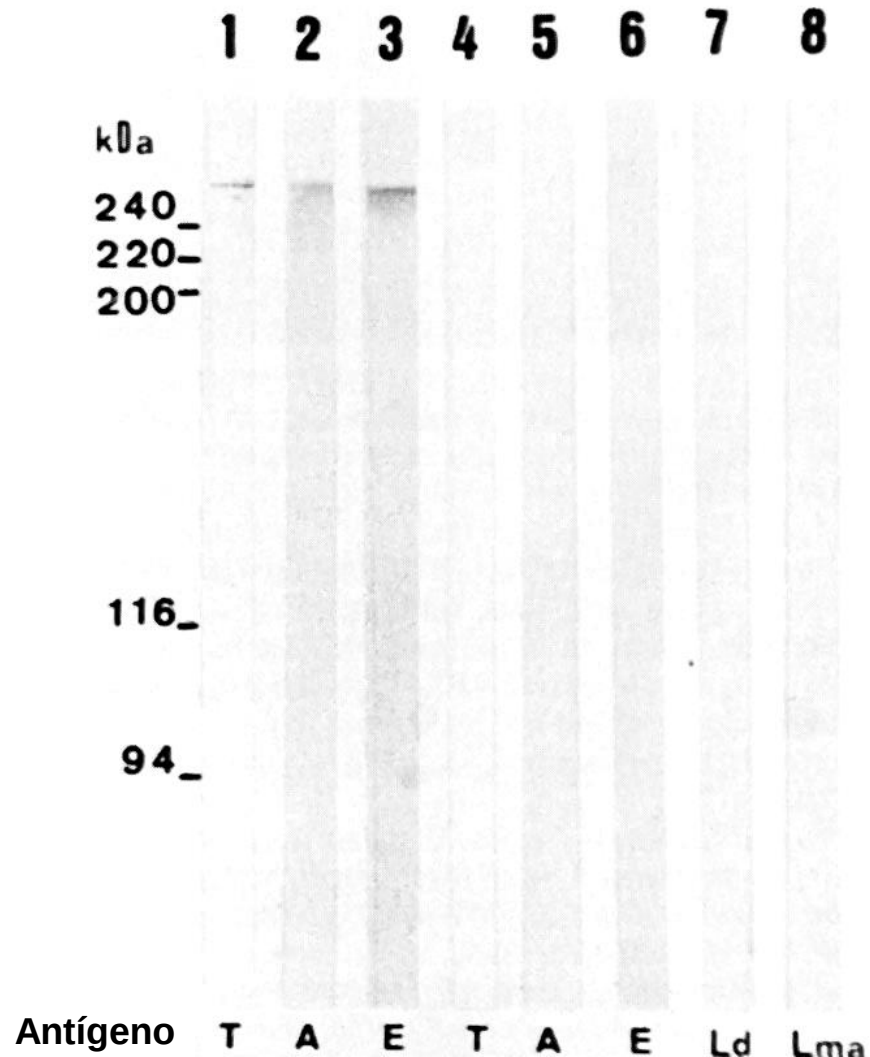
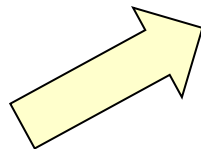


Produção e/ou Imunopurificação de AC anti Proteína Recombinante



36 kDa

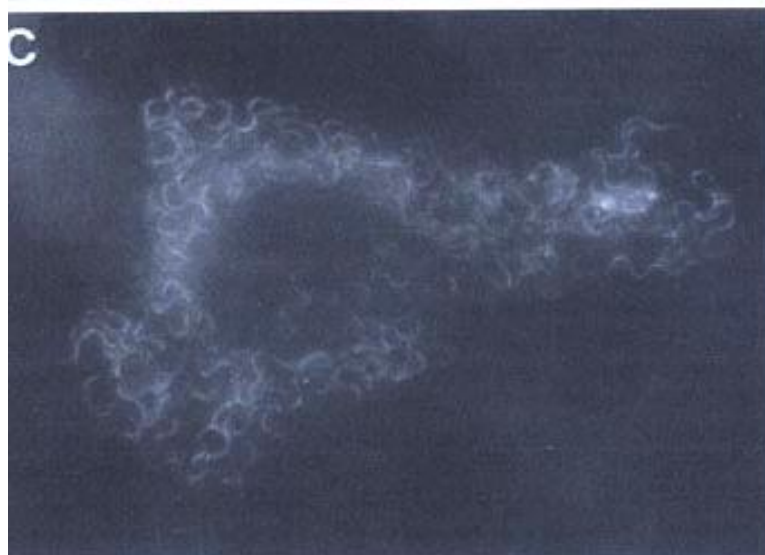
H 49



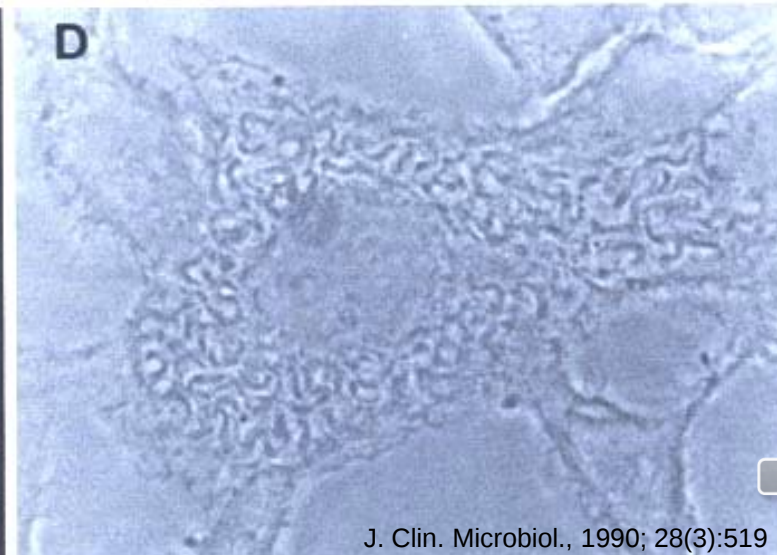
Localização do antígeno H49 por Imunofluorescência



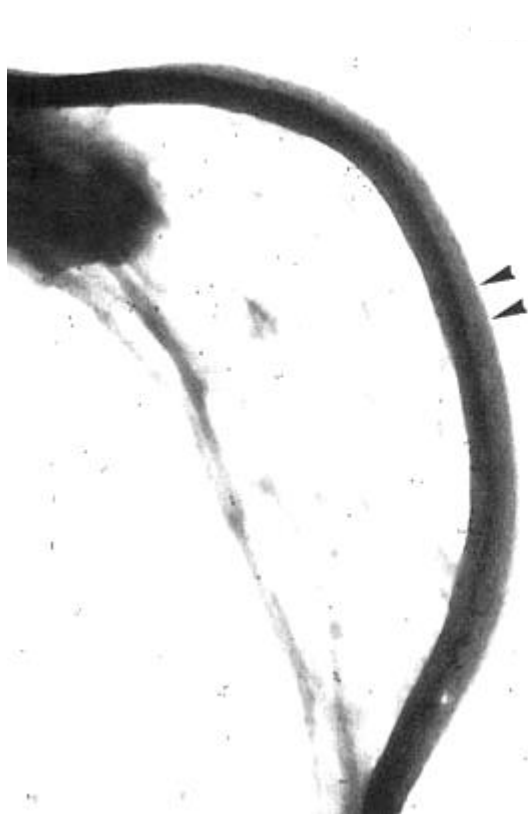
Cels HeLa
infectadas
48hs.



Cels HeLa
infectadas
72hs.



Localização do antígeno H49 por Imunoeletro microscopia



Citoesqueleto de: TCT



META

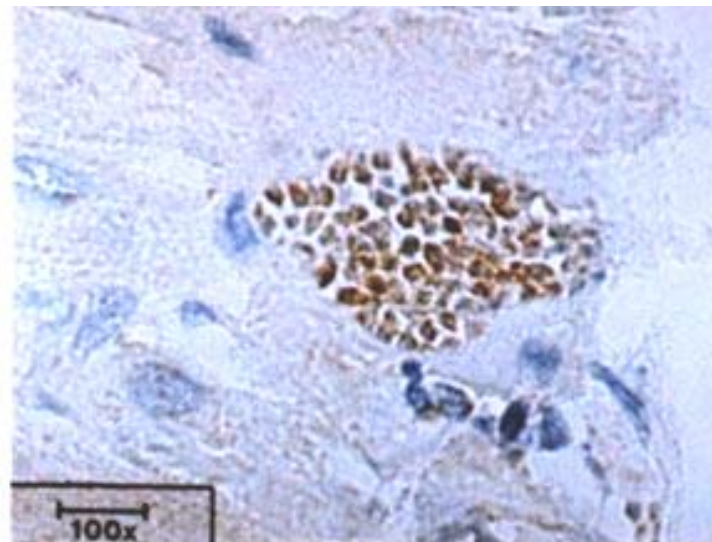
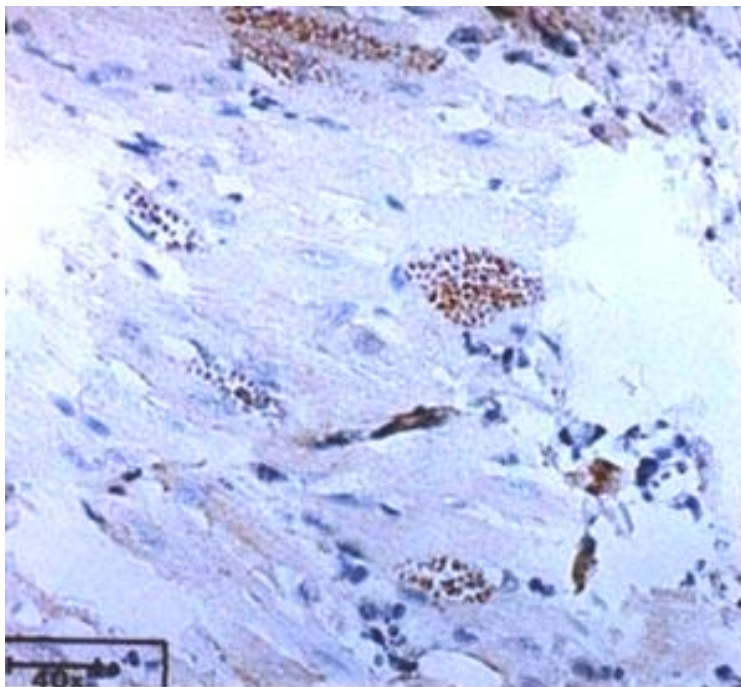


EPI

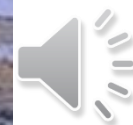
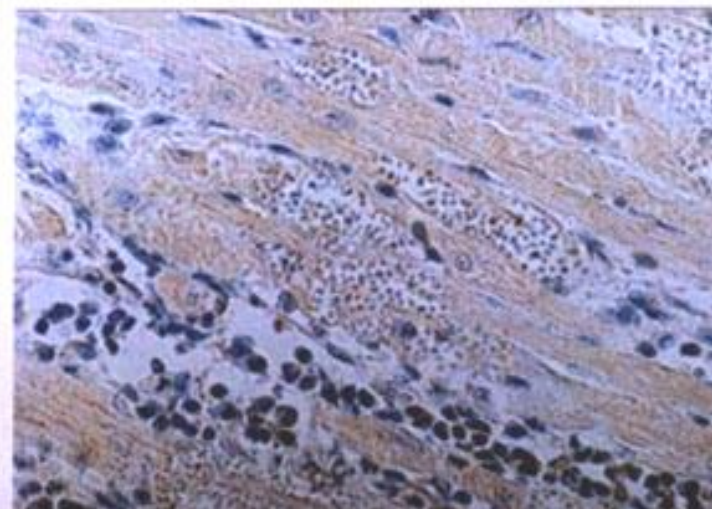
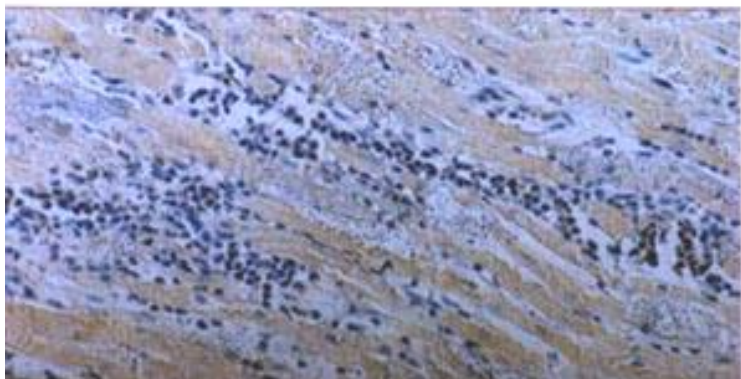


Imunodeteção do antígeno H49 em cortes Histológicos

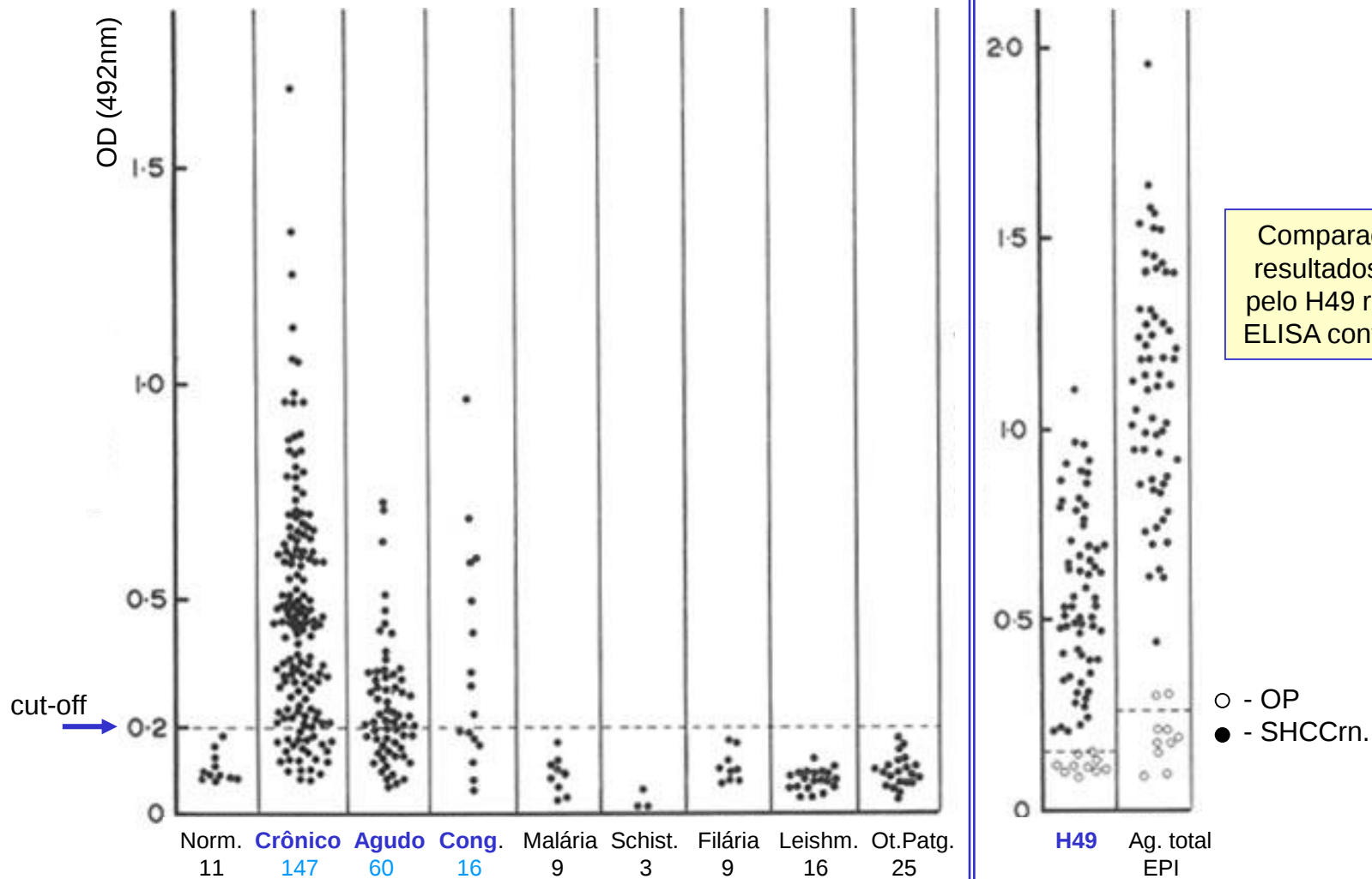
AC de
coelho
anti H49



AC de
coelho
anti GST



ELISA com antígeno H49 recombinante



Conclusão da performance do ELISA -H49

Soros Chagásicos do Brasil, Argentina, Uruguai e Venezuela

SENSIBILIDADE

Fase Crônica - 84%

Fase Aguda - 58%

Congênito - 56%

ESPECIFICIDADE -- 100%

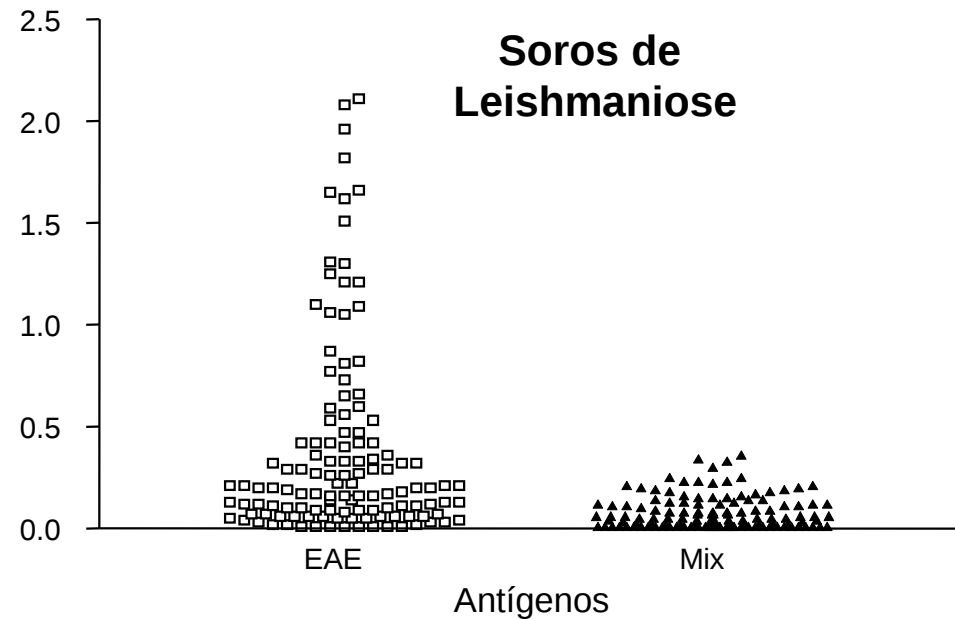
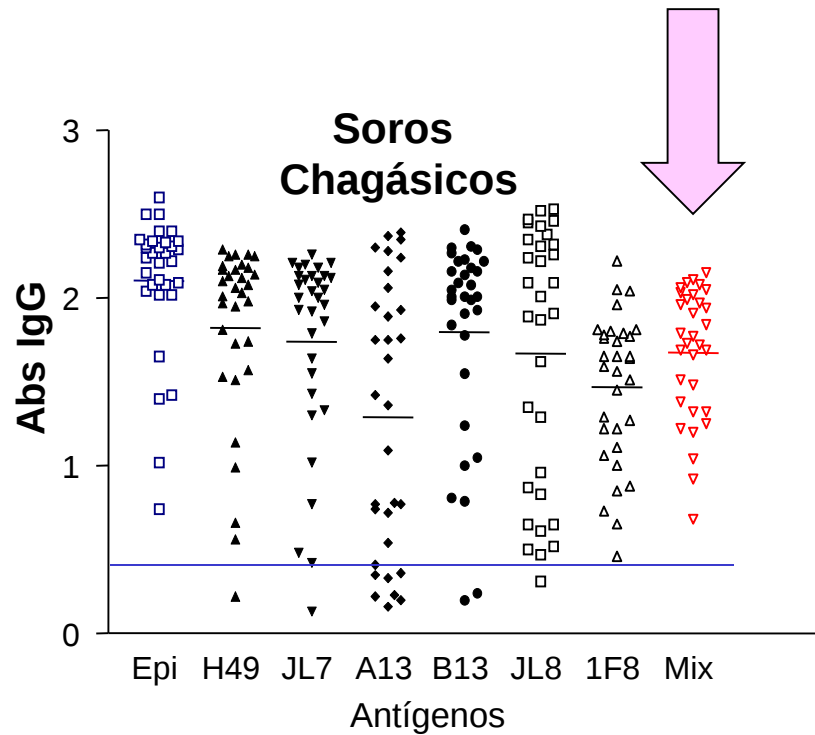
Ausência de reação cruzada com casos de leishmaniose

ANÁLISE COMPARATIVA POR ELISA

	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
H49	100%	100%
EPI	100%	80%



Avaliação das proteínas recombinantes (mixELISA)



Conclusões e Perspectivas

J.Clin.Microbiol. 37, 1554-1560, 1999

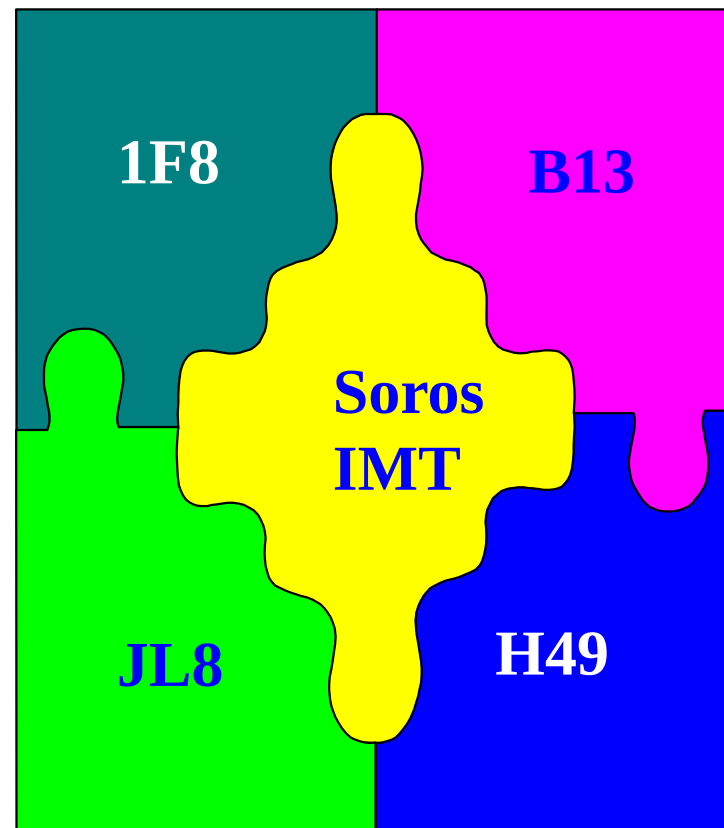
- O uso de antígenos recombinantes isolados não é satisfatório.
- O mix de antígenos recombinantes não é satisfatório para o diagnóstico de casos congênitos.
- O mix de antígenos recombinantes é bastante específico.



Tecnologia do DNA Recombinante

	Repeat AA	Protein kDa	Produto	Caract.
H49	68	>300	citoesqueleto	crônico
A13	no	230	ND	agudo e cr.
B13	12	116-140	superfície	crônico
JL8	14	>170	citoplasma	crônico
1F8	no	ND	flagelo	crônico

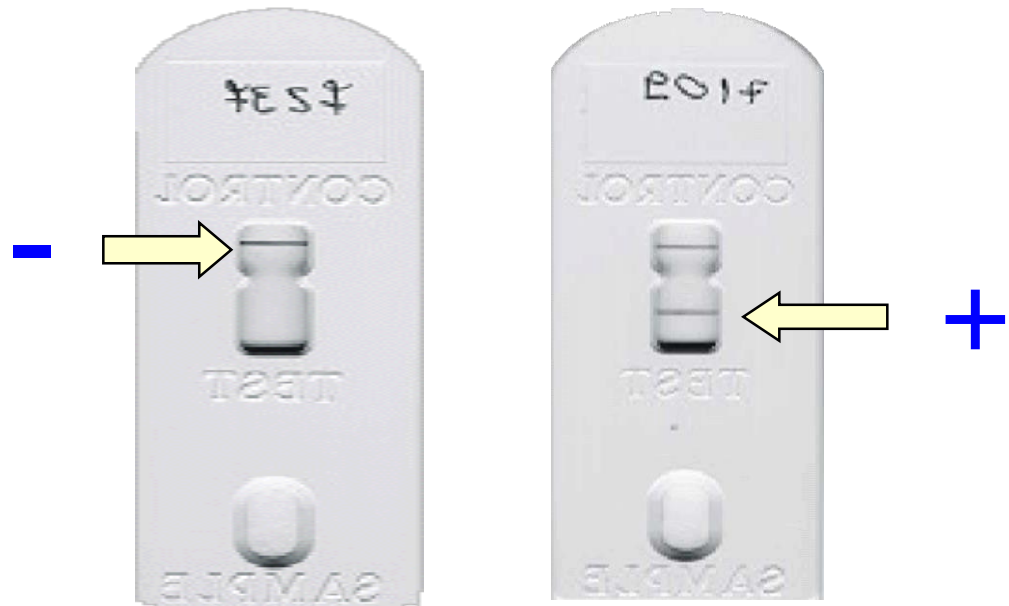
- Subclonagem em vetor pGEX.
- Expresso em fusão com Glutathione-S-transferase (GST).
- Purificado por cromatografia de afinidade com Glutathione-Agarose



Kit para Diagnóstico da Doença de Chagas Stat-Pak



Diag.Microbiol.Inf.Dis. 2003; 46:265-271



Teste Imunocromatográfico
Chembio Diagnostic Systems

CHAGAS STAT-PAK
A rapid immunochromatographic assay for
the detection of antibodies to Chagas
in serum or plasma
Lot and Expiration Date Printed on Pouches
For In Vitro Diagnostic Use Store at Room Temp
See Insert For Directions For Use
Chembio Diagnostics, Medford, New York 11763

LOT: CH010997
EXP: 31 DEC 98
For Export Only



Avaliação do kit Chagas Stat-Pak

- Avaliação em 393 amostras (BR central - estudo cego)

Sensibilidade (98,5%)

Especificidade (94,8%)

200 - Chag.Cron. (8 a 69 anos)

150 - normais

43 - OP 9 LV, 10 LMC, 11 HCV
3 HIV, 10 D.Autoimunes

- Avaliação em 352 amostras (4 países da Am.Latina)

Sensibilidade (100%)

Especificidade (98,6%)

279 - Chag.Cron. (IHA,IFI,ELISA)

73 - não chagásicos



vamos descansar..

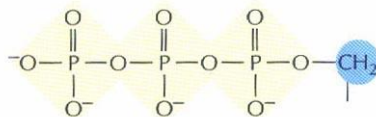






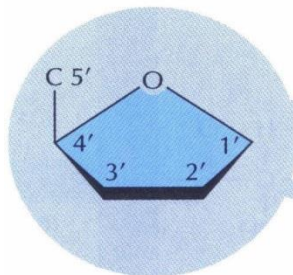
Composição química dos ácidos Nucleícos

1 FOSFATOS

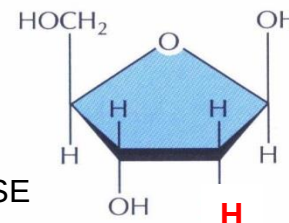


Não hidrolisa
com NaOH

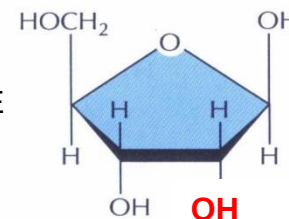
2 AÇÚCARES (pentose)



DESOXIRRIBOSE

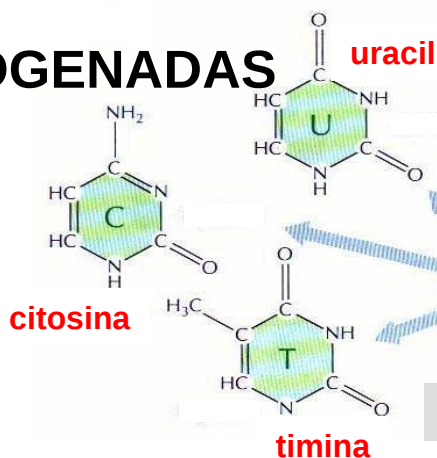


RIBOSE

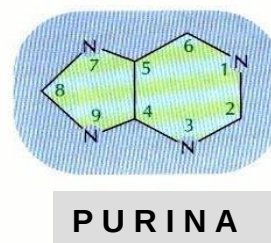


3 BASES

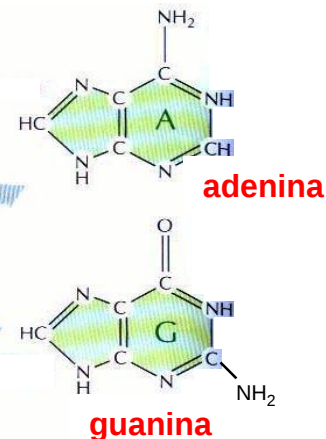
NITROGENADAS



PIRIMIDINA



PURINA



Composição química dos ácidos Nucleícos

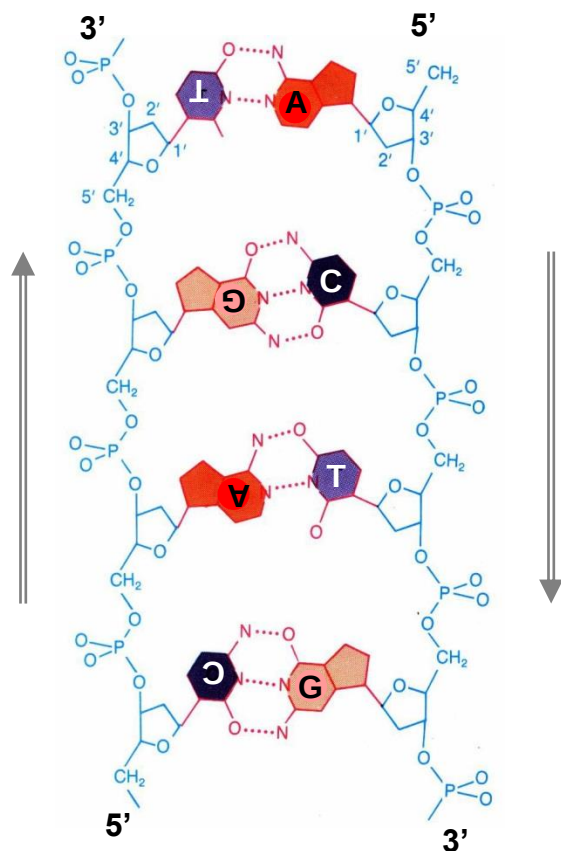
PURINAS - A G

PIRIMIDINAS - C T U

Pontes de Hidrogênio

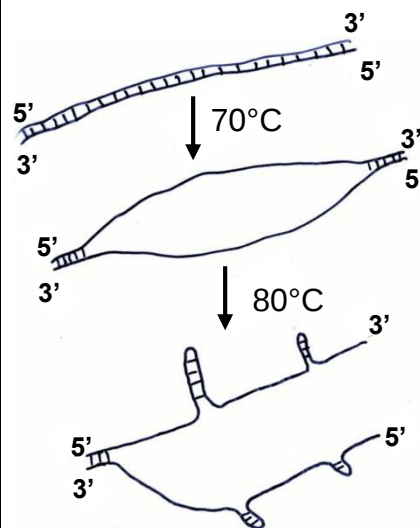
A $\equiv$ T

C $\equiv$ G

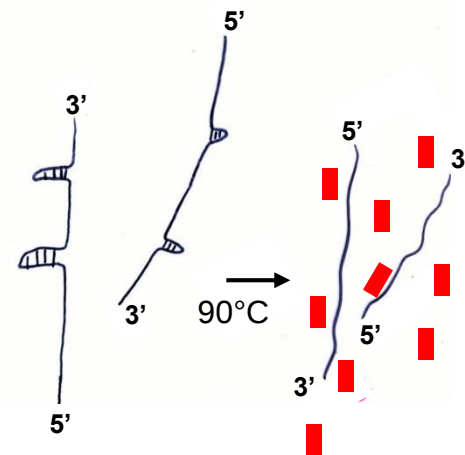


Propriedade físicas e químicas do DNA:

- Viscosidade
- Sedimentação em Gradiente de CsCl (+ CG, + denso)
- Denaturação: Química - pH < 4 ou > 11 (NaOH)
Física - T_m (proporcional ao CG)



85°C

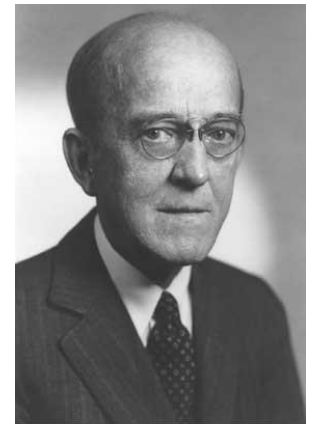
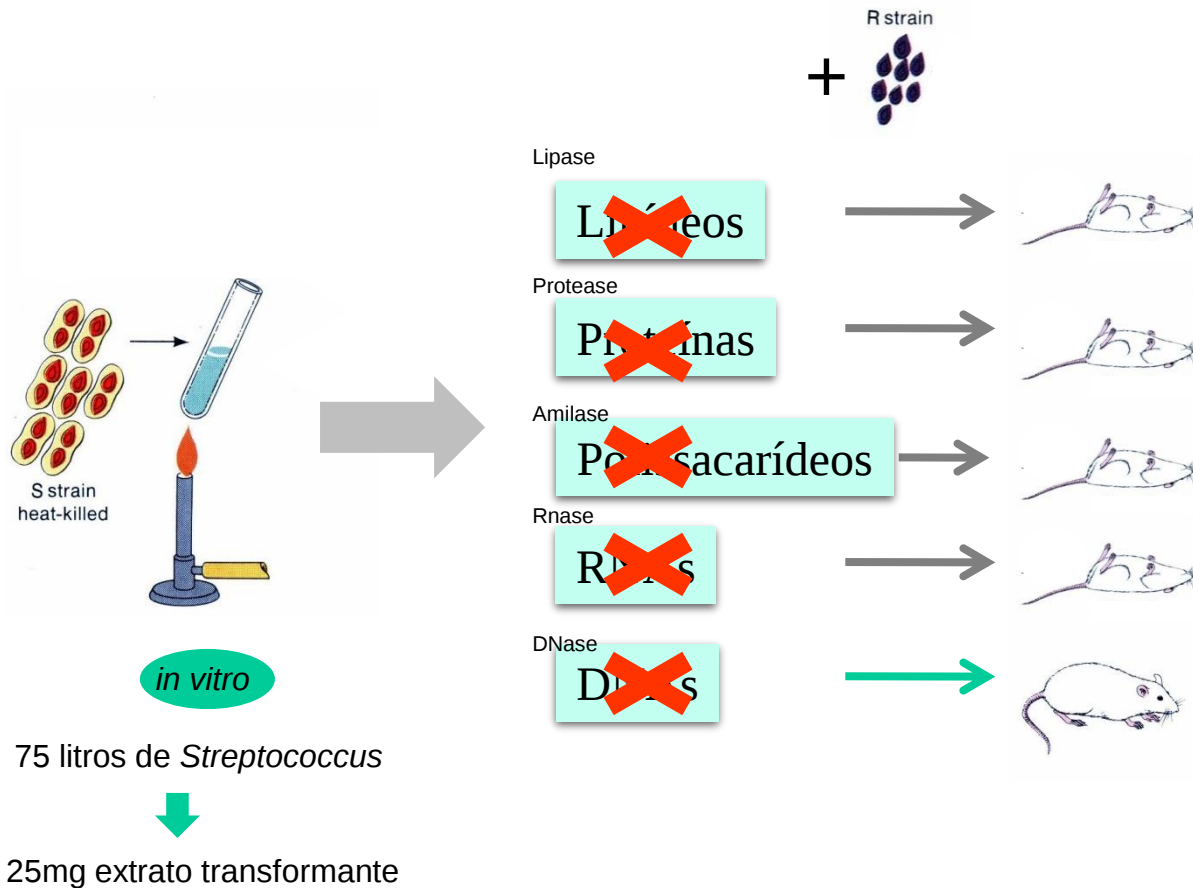


Hibridização
Estringência



Identificação do material hereditário em bactérias

primeira demonstração que os genes eram compostos por DNA



Library of Congress

Oswald T. Avery, 1944



Clonagem molecular: APLICAÇÕES

1- Ferramentas para Pesquisa Básica:

2- Diagnóstico: agentes de doenças infecto-parasitárias

- Produção em larga escala de **proteínas recombinantes** para kits de ELISA, etc.
- **Sondas de DNA** (hibridização e/ou PCR): diagnóstico de paternidade, aplicações forenses, doenças genéticas, estudos antropológicos, arqueológicos e filogenéticos.

3- Produção de Vacinas: definição e pureza do antígeno, reprodutibilidade e custo de produção.

4- Produção de Substâncias Biologicamente Ativas: uso terapêutico, como :insulina, δ -interferon, fatorVIII de coagulação, hormônio de crescimento; VANTAGENS → pureza do fármaco, idêntico ao natural, custo de produção e reprodutibilidade.

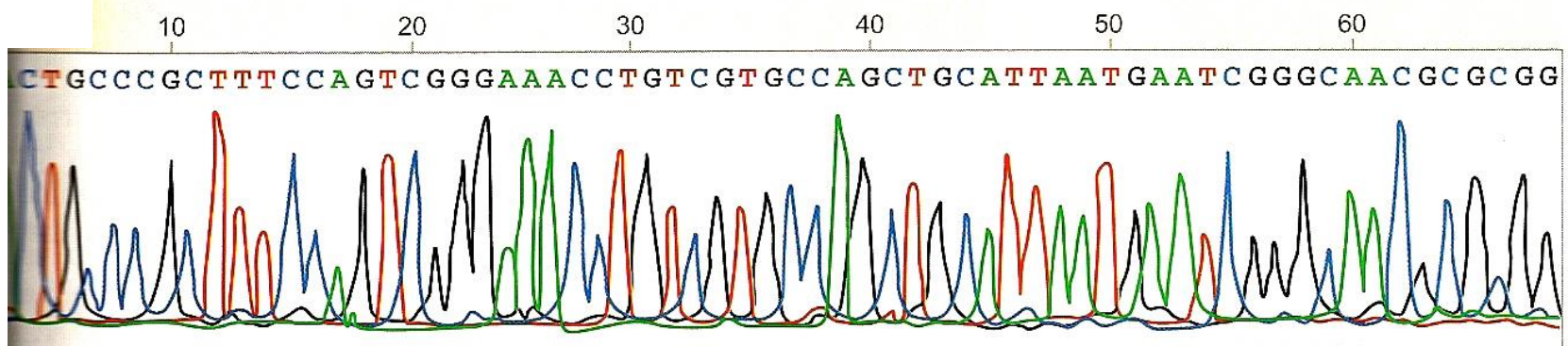
5- Alteração das características animais e vegetais:

- Produção de organismos **transgênicos**. **a)** melhores índices de produtividade (prod. comercial), **b)** imunidade a doenças e pragas, **c)** melhor valor biológico (proteína ricas em AA essenciais em vegetais), **d)** modelos de estudo em pesquisa.
- **Terapia gênica.**

Sequenciadores automáticos

Como sequenciar um genoma inteiro ?? → genoma humano tem 3 bilhões de pb

- Em 1990 500pb era obtido após 1 a 2 dias de longo esforço e concentração.....
- Hoje os métodos automáticos não usam o gel e sim colunas ou capilares
- O processo leva 2 a 3 horas com rendimento de 700 a 800 pb
- O grande avanço veio com o uso de ddNTPS fluorescentes e leitura pelo sensor



(a)

5' TAGCTGACTC 3'
3' ATCGACTGAGTCAAGAACTATTGGGCTTAA...

DNA polymerase
+ dATP, dGTP, dCTP, dTTP
+ **ddGTP** in low concentration

5' TAGCTGACTCAG 3'
3' ATCGACTGAGTCAAGAACTATTGGGCTTAA...

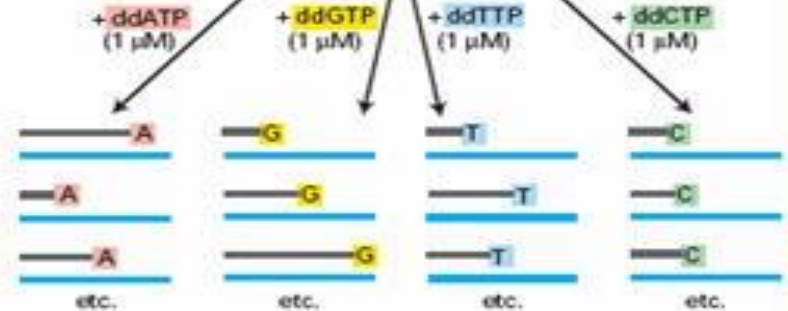
5' TAGCTGACTCAGTTCTT 3'
3' ATCGACTGAGTCAAGAACTATTGGGCTTAA...

5' TAGCTGACTCAGTTCTTGATAACCC 3'
3' ATCGACTGAGTCAAGAACTATTGGGCTTAA...

(b)

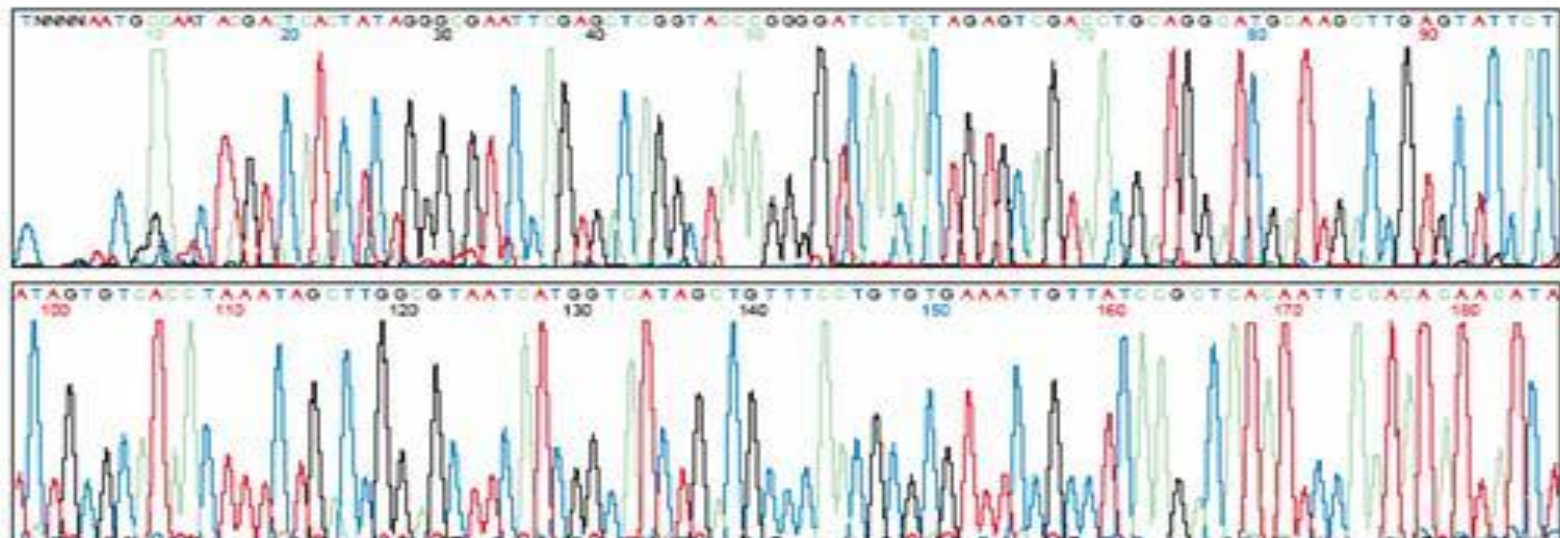
Primer 5' —
Template 3' — 5'

DNA polymerase
+ dNTPs (100 μM)



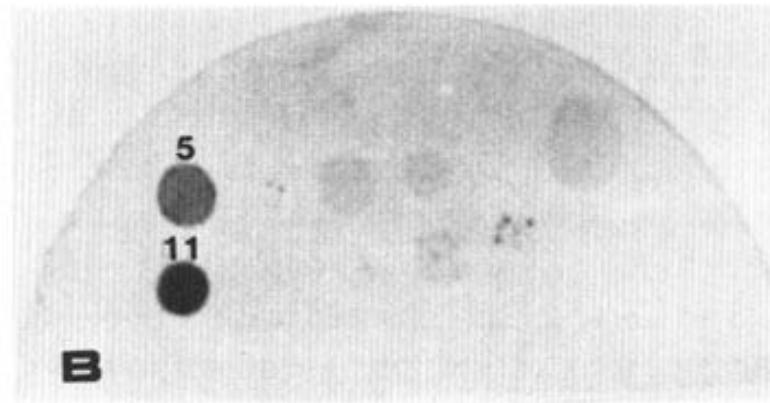
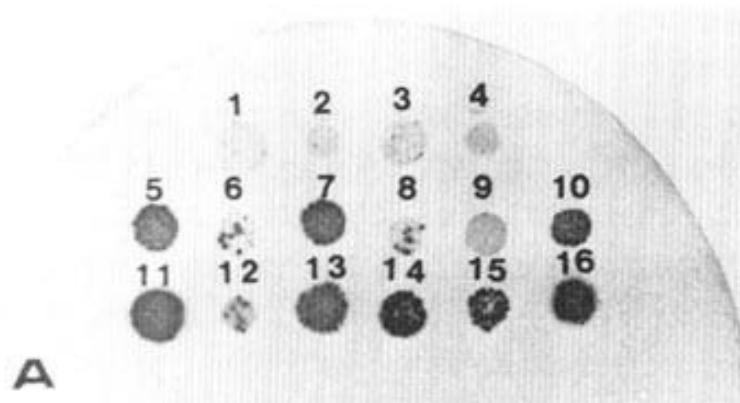
Denature and separate daughter strands by electrophoresis

(c)

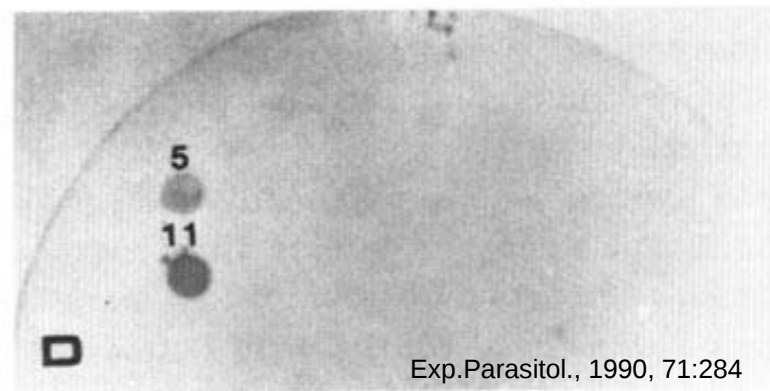


Reatividade dos clones *T.cruzi* com Anticorpos das classes IgM e IgG

IgG



IgM



Exp.Parasitol., 1990, 71:284

CHAGÁSICOS
CRÔNICOS

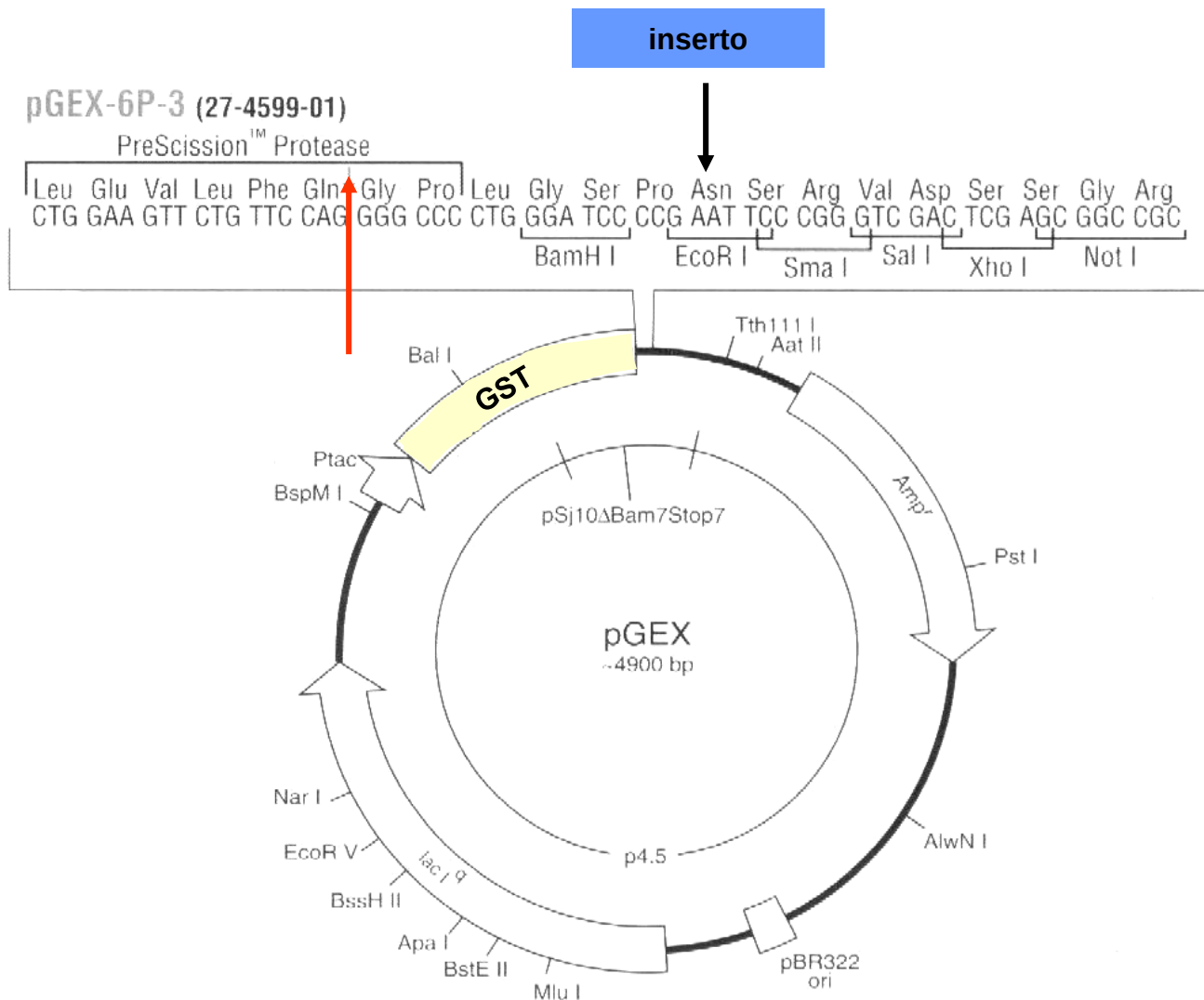
CHAGÁSICOS
AGUDOS

1 - 4 λ gt11

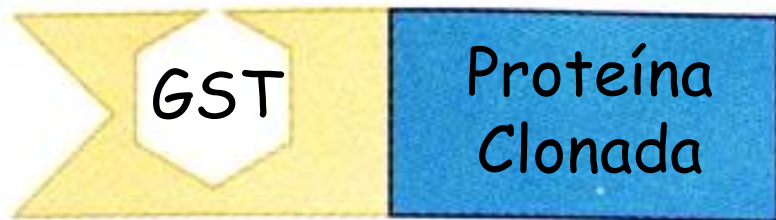
5 - 16 clones recombinantes de *T.cruzi*

5 - clone H3; 7 - clone H49; 11 - clone A13

Clonagem do DNA de interesse em vetor especializado na expressão em larga escala



Purificação da Proteína Expressa em fusão com a GST



Cromatografia em Coluna de Glutathiona Sefarose 4B

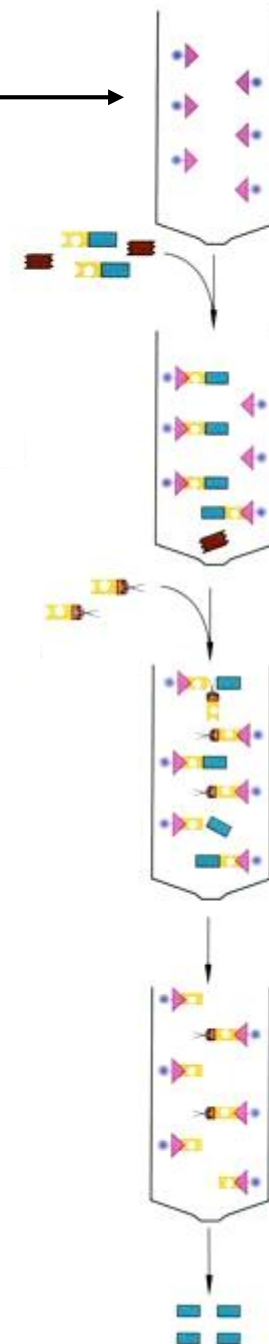
1 - Adc. extrato da Prot. de fusão com GST em GS4B



2 - Adc. Protease Específica

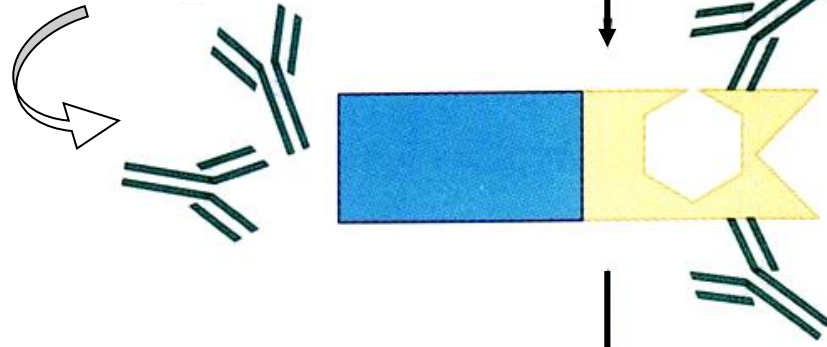


3 - Eluição da Proteína Clonada

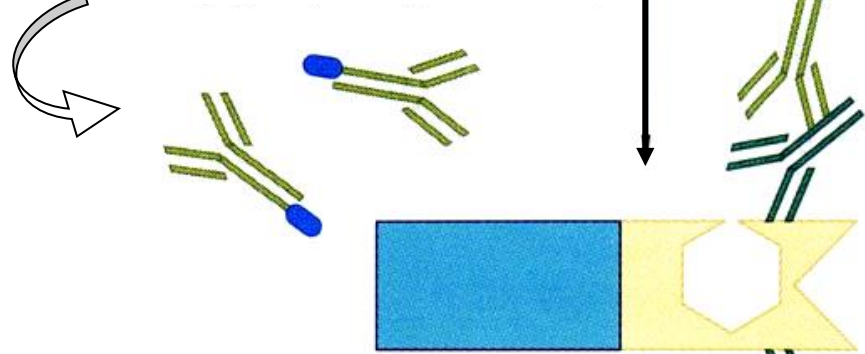




1- Adc. anticorpo anti-GST de cabra



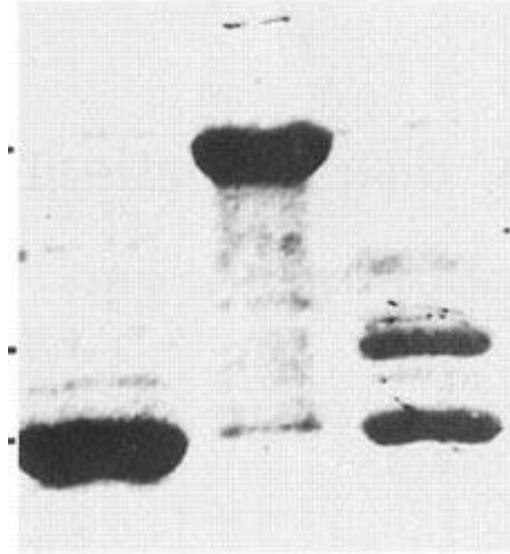
2- Adc. anticorpo anti-cabra conjugado com Peroxidase



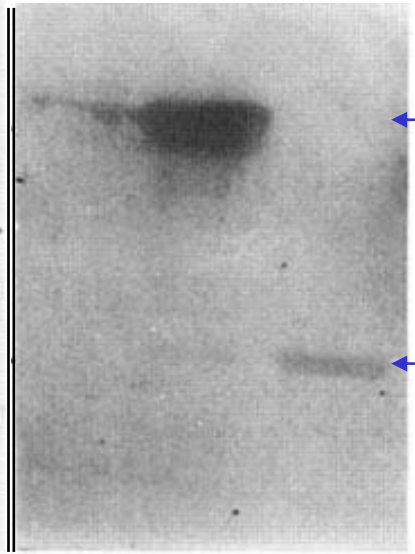
3- Detecção da Proteína de fusão em Western-blot

Análise de uma proteína recombinante de *T.cruzi*

GST GST H49 Clivagem fator Xa



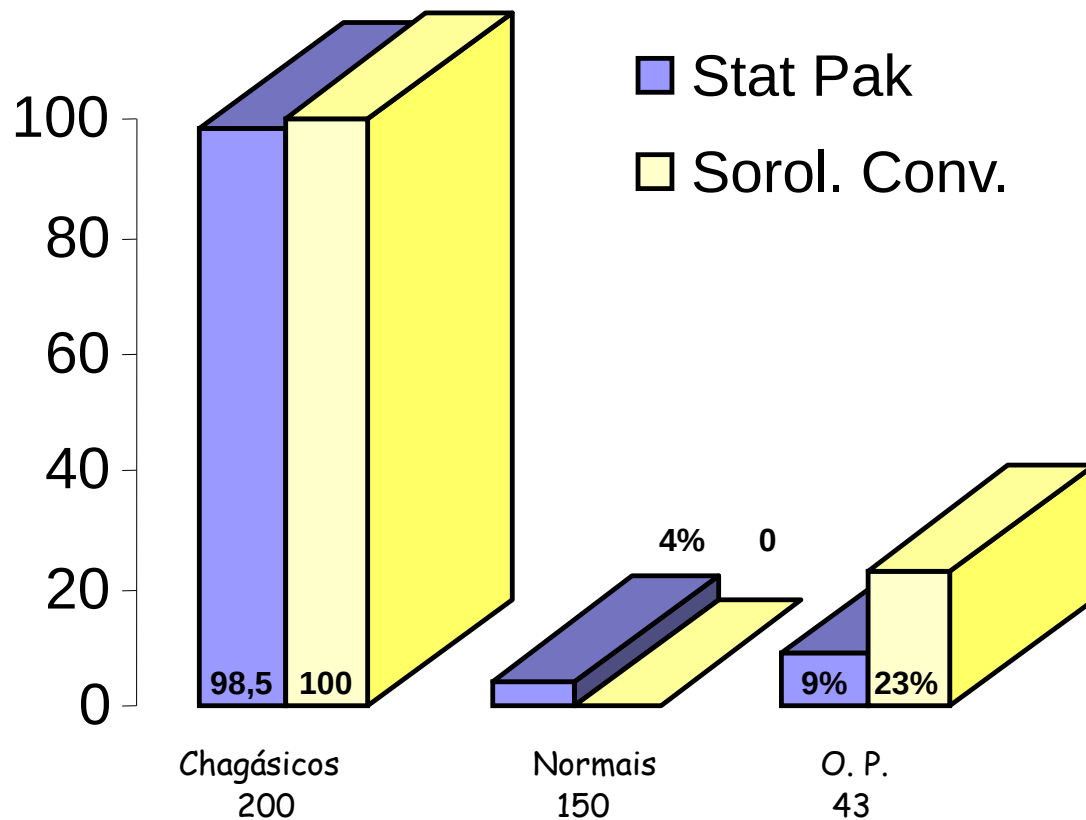
SDS-PAGE (Coomasie blue)



W.B. SHChag.

Par.Immun. 1994, 16(3):165

Avaliação do kit Chagas Stat-Pak



200 - Chag.Cron. (8 a 69 anos)

150 - normais

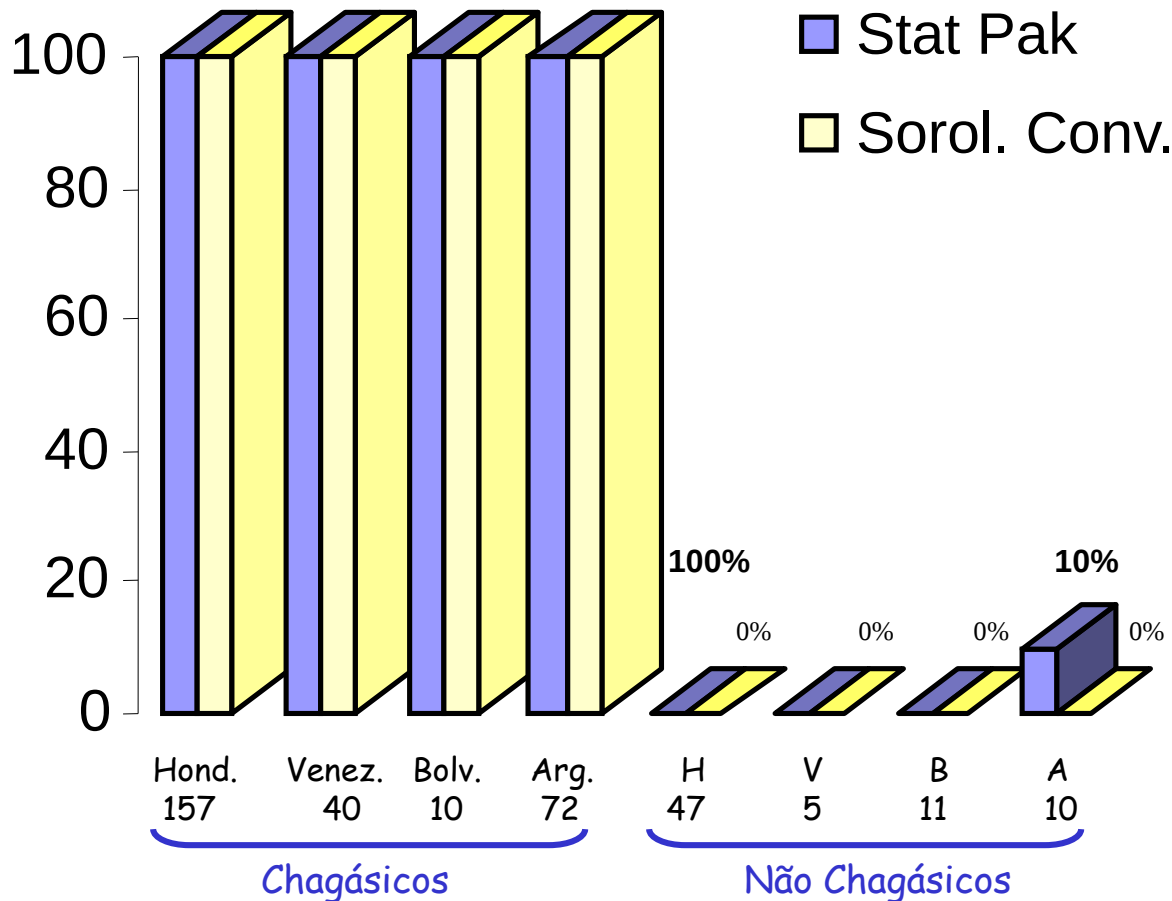
43 - OP 9 LV, 10 LMC, 11 HCV
3 HIV, 10 D.Autoimunes

393 amostras brasileiras

Sensibilidade - 98,5%

Especificidade - 94,8%

Avaliação do kit Chagas Stat-Pak



279 - Chag.Cron. (IHA,IFI,ELISA)

73 - não chagásicos

352 amostras 4 países

Sensibilidade - 100%

Especificidade - 98,6%



Avaliação do kit Chagas Stat-Pak

Discussão:

ESPECIFICIDADE - de 19 soros de LV e LMC, 2 (10,5%) reagiram no Stat Pak; contra 10 (52%) na Sorologia Convencional.

Variabilidade do *T.cruzi* X Características imunogênicas do hospedeiro.

Alta sensibilidade e Especificidade em zonas endêmicas (*T.cruzi* I e II).

OMS recomenda ao menos dois testes em paralelo para se obter 98%

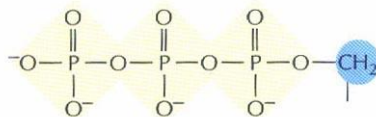
Stat Pak é rápido (15 minutos), avaliado a olho nu, fácil manipulação (não requer aparelhagem alguma), pode ser estocado a temp. ambiente, reação fica no cassete podendo ser reavaliada posteriormente.

Recomendado para trabalhos de campo.

Composição química dos ácidos Nucleícos

1

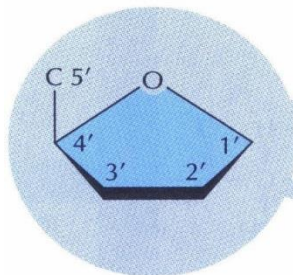
FOSFATOS



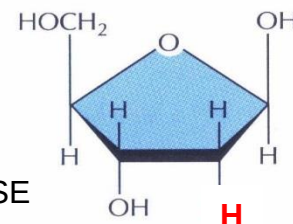
Não hidrolisa
com NaOH

2

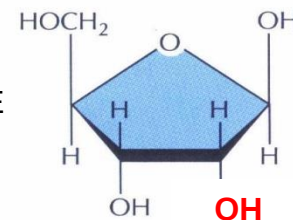
AÇÚCARES (pentose)



DESOXIRRIBOSE

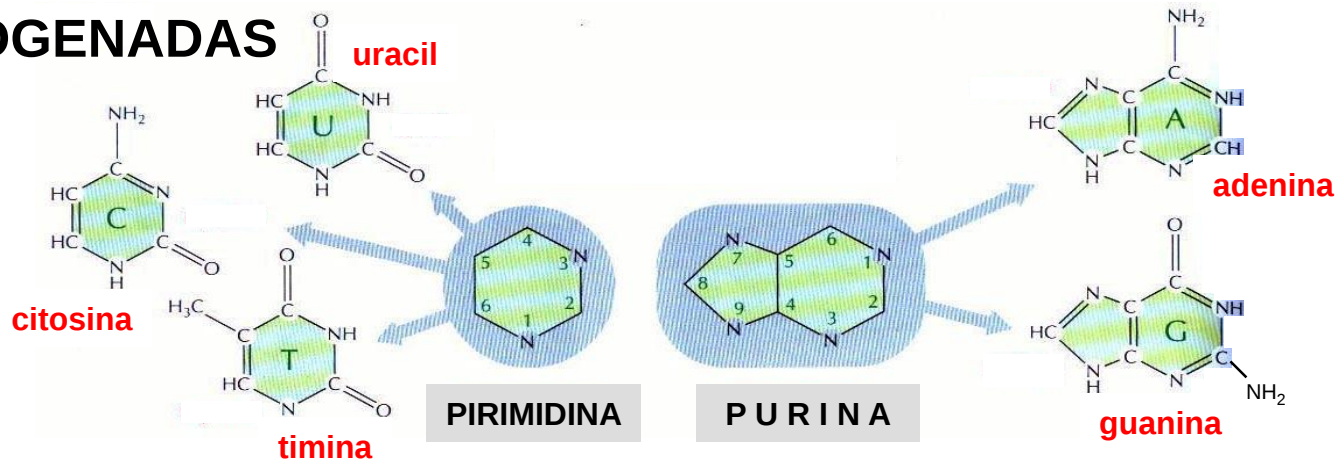


RIBOSE



3

BASES NITROGENADAS



Produção do DNA complementar (DNA-c)

Seqüências de DNA que estão sendo transcritas em RNA (genes).

Genes específicos de uma determinada fase evolutiva do organismo.

Genes freqüentemente transcritos.

Introns são removidos através do RNA 'splicing' que ocorre durante a formação do RNAm.

Seqüências de DNA não transcritas (espaçadores, regiões inter e intra gênicas) não são obtidas em uma genoteca de cDNA

