

### A PLATAFORMA DE GENÔMICA FUNCIONAL UTILIZADA COMO SUPORTE EM PROGRAMAS DE INOVAÇÃO BIOTECNOLÓGICA.

Carlos R. Borges Neto<sup>1</sup>, Edmilson M. de Oliveira<sup>2</sup>, Luciana B. D. Labuto<sup>3</sup>,  
Adauto S. Castro<sup>4</sup>, Zilma Alves dos Reis Sousa<sup>5</sup>, Silvanete Margarida da Rocha<sup>6</sup>

#### 1. INTRODUÇÃO

O estudo sistemático dos genomas fundamentou-se pela utilização das ferramentas desenvolvidas com a Tecnologia do DNA recombinante, TDR, expandindo o conceito básico de mapeamento genético até então proposto no início do século (STURTEVANT, 1913). A construção de mapas genéticos completos dos cromossomos evoluiu para o estudo dos genes individuais e, finalmente, o repertório gênico de uma espécie pode ser determinado. Em 1983, pela primeira vez, a aplicação destes recursos gerados pela TDR pode evidenciar-se (MARGOLIS et al., 2005) quando o gene responsável pela expressão do fenótipo ligado a doença de Huntington foi mapeado no cromossomo 4 em humanos. Posteriormente, vários genes relacionados à enfermidades em humanos foram mapeados em sítios cromossômicos específicos ocasionando uma revolução na genética médica (BONATO, 2003; CHILDREN'S..., 2004).

O microrganismo *Haemophilus influenza*, uma bactéria patógena, foi o primeiro genoma completamente seqüenciado em 1995 (CALICH e VAZ, 1989). A partir de então, genomas dos mais variados organismos desde procariontes a eucariontes tais como leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), insetos (*Drosophilla melanogaster*), vegetais superiores (*Arabidopsis thaliana*), mamíferos (*Homo sapiens*) tem sido decifrados (BOROVIK et al., 2003; BROWN, 2003).

O sequenciamento de genomas completos possibilitou determinar uma relação entre o tamanho e a complexidade dos organismos, tais como o gênero *Arabidopsis*, com cerca de 25.488 genes, e *Oryza sativa*, com aproximadamente 40.000 genes (HORAN et al., 2005). Atualmente a tecnologia para análise genômica tem-se utilizado de equipamentos cada vez mais sofisticados capazes de produzir milhares de pares de base por dia, e, proporcionando uma alta qualidade de dados.

<sup>1</sup>D.Sc. Produção Vegetal – Técnico de Nível Superior III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Engº. Florestal - Técnico de Nível Superior I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Assistente de Operações I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Graduando em Biologia UNICEUB.

<sup>4</sup> Assistente de Operações I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Graduando em Farmácia UnB.

<sup>5</sup> Bolsista Projeto Genolyptus, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Nível Médio.

<sup>6</sup> Estagiária Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Nível Médio.

Portanto, mapas genéticos, antes construídos utilizando-se de marcadores moleculares,

Além disso, as informações oriundas dos projetos genoma possibilitam o estudo comparativo entre as mais variadas seqüências gênicas permitindo uma avaliação precisa sob os aspectos envolvendo a similaridade e identidade entre os genes e o produto destes, bem como o estabelecimento dos graus de proximidades a identificação das famílias gênicas. Ainda, a identificação de elementos gênicos e seus produtos, hierarquicamente conservados na escala evolutiva.

A análise genômica por sequenciamento teve como conseqüência uma revolução entre as variadas áreas de pesquisa, como na classificação taxonômica dos organismos, anteriormente baseado apenas em caracteres morfológicos.

Como perspectivas futuras na aplicação desta ferramenta, embora hoje a técnica de sequenciamento de genoma seja apenas mais uma etapa envolvida em processos relacionados ao estudo e caracterização de genes, ainda faz-se necessário o conhecimento da constituição das seqüências gênicas primárias na caracterização funcional, estrutural ou topológico das moléculas produzidas em organismos vivos.

Em relação ao estudo dos processos evolutivos tais como a seleção, adaptação, na diferenciação celular e nas mutações, e, considerando-se que as alterações de natureza física ou química afetam constantemente a constituição dos seres vivos, a existência de uma flexibilidade na composição dos genomas é um considerável fator evolutivo monitorável através de sequenciamento.

Sob o aspecto da análise de impactos futuros na genética vegetal as pesquisas ligadas a compreensão do espectro de variação genética por complementação gênica das espécies em relação a características economicamente viáveis e o mapeamento de regiões ligadas a processos de regulação da expressão gênica diferencial em tipos e

atualmente, podem ser executados apenas em alguns dias.

fases de diferenciação celulares distintos constituem uma área de grande interesse.

Portanto, encontra-se entre as prerrogativas do estudo contemporâneo dos genomas a construção de bibliotecas genômicas, a obtenção de mapas genômicos indicando a variabilidade das seqüências dos genes intra e interespecíficas e o estabelecimento dos graus de diversidade gênica. Também a caracterização de mutantes, o estudo patológico de alguns genes e, finalmente, o potencial estudo do controle da expressão diferencial tem alimentado um amplo campo de pesquisa dentro da biologia molecular e outras áreas de interesse futuros (EGGEN et al., 2001; EMBRAPA..., 2003a; EMBRAPA..., 2001; EMBRAPA..., 2003b; EWING e GREEN, 1998; GOMES, 2000).

Assim, atualmente com a disponibilidade de bibliotecas genômicas dos mais variados organismos a utilização de mutantes e, de genes promotores e reguladores de expressão torna-se viável a produção de organismos geneticamente manipulados em acordo com características de interesse.

A integração de métodos clássicos de melhoramento genético com as estratégias e tecnologias da genômica levará ao estabelecimento de novos paradigmas para o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Ela se sustenta no chamado melhoramento molecular ("*molecular breeding*") que utiliza informações de mapas genéticos saturados com marcadores moleculares, mapas físicos construídos com base em bibliotecas de grandes insertos de DNA e análise genético-quantitativa, para identificar as regiões do genoma que contêm genes de interesse econômico. A clonagem de genes através de estratégias de avaliação de genes candidatos nas regiões identificadas, ou de seleção assistida por marcadores moleculares integrada a métodos de retrocruzamento ou seleção recorrentes são métodos já empregados com sucesso em programas públicos e privados.

Atualmente, técnicas envolvendo a análise e a identificação dos genes expressos, assim como dos

genes silenciosos, em uma célula estão sendo desenvolvidas. Aliado a isso, várias estratégias envolvidas na análise da expressão dos produtos gênicos, as proteínas, tem gerado uma grande expectativa em relação ao estudo dos proteomas. Esta constitui uma área a qual deverá receber grande atenção nos próximos anos e, certamente, promoverá a expansão do conhecimento biológico de maneira ainda mais acelerada.

Uma vez que o espectro de proteínas expressa dentro da célula determina sua biologia, descrições amplas da constituição protéica e da escala de expressão temporal dos genes serão a base para a compreensão precisa da diferenciação celular.

A disponibilidade de catálogos completos de genes e proteínas dos organismos tem alterado a pesquisa para uma perspectiva global nos processos da vida em função dos genes em sua totalidade, bem como das proteínas. Entretanto, ao mesmo tempo, surge um grande desafio para a ciência em detrimento de uma enorme quantidade de dados a serem interpretados e assimilados pelo conhecimento da bioinformática na pesquisa genômica.

O objetivo atual tem como meta principal utilizar-se das informações com o intuito de desvendar o complexo circuito molecular que opera dentro da célula, ou seja, mapear a rede de interações protéicas determinantes das várias funções celulares. O uso de estratégias gene-específicos para interromper a função de cada componente celular e estudar os efeitos de tais dissociações nos outros genes e proteínas celulares será necessariamente desenvolvido nos próximos anos.

## **2. OBJETIVO**

O presente documento objetiva divulgar as regras de funcionamento da Plataforma Genoma

Funcional, bem como os protocolos e a produção do laboratório. Além do exposto contém um relato das atividades e treinamentos realizados pela equipe técnica dessa.

## **3. HISTÓRICO**

A Plataforma de Genômica Funcional foi fundada em 14 dezembro de 2001 sob a gestão do Dr. Genaro Ribeiro de Paiva, Pesquisador III, sobre a premissa da necessária existência de uma infraestrutura centralizada para a geração de dados de sequenciamento em escala, utilizando-se de métodos de alto desempenho, no atendimento das necessidades de sequenciamento de DNA dos vários projetos como: Café, Eucalipto, Banana, Bovinos entre outros oriundos de parcerias com os vários centros de pesquisa da empresa e de instituições nacionais e internacionais. Sendo, portanto, econômica e tecnicamente de maior viabilidade e eficiência.

A composição da equipe técnica da Plataforma neste período apresentava os seguintes membros: Carlos Rodrigues Borges Neto (Técnico de Nível Superior III), Edmilson Martins de Oliveira (Técnico de Nível Superior I), Patrícia Valle Pinheiro (Técnico de Nível Superior II), Adauto Castro Silva (Assistente de Operações I), Luciana Beatriz Dutra Labuto (Assistente de Operações I), Tula Beck Bisol (Assistente de Operações I); - Estagiários e Bolsistas => Ana Cláudia de Moraes Reis (Bolsista Projeto Genoma Bovinos), Andréia Silva Castro (Estagiária da EMBRAPA), Graziella Santana Feitosa Figueiredo (Bolsista Projeto Genoma Bovinos), Jussara Martins Peres Lopes (Estagiária Projeto Genolyptus), Kelly Martins de Brito (Bolsista Projeto Genoma Café), Silvanete Margarida da Rocha (Estagiária da EMBRAPA), Vivian do Nascimento Andrade (Bolsista Projeto Genoma Café), Viviane Ferreira de Souza (Bolsista

Projeto Genoma Bovinos), Zilma Alves dos Reis Sousa (Bolsista Projeto Genolyptus).

Posteriormente, em 19 de agosto de 2002, foi nomeado um Comitê Gestor da Plataforma Genômica com a finalidade de se disciplinar o funcionamento, atuar na solução dos problemas referentes a mesma e propor melhorias de uma forma conjunta.

O primeiro Comitê Gestor da Plataforma Genômica, atuou até a data de 21 de julho de 2003 e apresentava a seguinte composição dos membros: Luis Antônio Barreto e Castro (Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Alexandre Caetano (Pesquisador III), Dário Grattapaglia (Pesquisador III), Márcio Elias Ferreira (Pesquisador III).

Um segundo Comitê Gestor apresentando os seguintes componentes: José Manuel Cabras S. Dias (Chefe Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Alexandre Caetano (Pesquisador III), Dário Grattapaglia (Pesquisador III), Márcio Elias Ferreira (Pesquisador III) atuou de 21 de julho de 2003 a 21 de julho de 2004.

Em 21 de julho de 2004 foi nomeado um novo Comitê Gestor da Plataforma Genômica.

#### **4. COMPOSIÇÃO DO COMITÊ GESTOR**

Dr. Maurício Antônio Lopes – Presidente

Dr. Alexandre Caetano – Membro

Dr. Dário Grattapaglia – Membro

Dr. Márcio Elias Ferreira – Membro

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá – Membro

Dr. Mauro Carneiro – Membro

Dra. Patrícia Messemberg – Membro

Rosemary Vilaça, MSc – Secretário

Executivo

#### **5. EQUIPE TÉCNICA**

Rosemary Vilaça – Técnico de Nível Superior I

Luciana Beatriz Dutra Labuto – Técnico de Nível Superior I

Adauto Castro Silva – Assistente de Operações I

#### **6. ESTAGIÁRIOS E BOLSISTAS**

Silvanete Margarida da Rocha – Estagiária da EMBRAPA

Zilma Alves dos Reis Sousa – Bolsista Projeto Genolyptus

#### **7. A PLATAFORMA**

A Plataforma de Sequenciamento de DNA é uma unidade central da EMBRAPA, cuja a principal função é a prestação de serviços de sequenciamento de DNA e procedimentos correlatos para todos os pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, bem como de outras unidades descentralizadas da empresa e a toda a comunidade científica em acordo com contratos específicos e disponibilidade de tempo e recursos.

#### **8. MISSÃO**

A Plataforma de Genômica Funcional tem como missão gerar dados de sequenciamento em escala utilizando-se de métodos de alto desempenho e justificando-se como economicamente mais viável e tecnicamente mais eficiente a existência de uma infraestrutura centralizada para o atendimento das necessidades de sequenciamento de DNA de vários projetos. Ainda, proporcionando aos pesquisadores a possibilidade de uma maior dedicação à análise e interpretação de dados, realizando experimentos

específicos demandados por seus projetos baseados nas informações de sequenciamento geradas pela Plataforma.

## **9. COMPOSIÇÃO E CAPACIDADE**

A Plataforma opera dois sequenciadores automáticos de DNA, marca Applied Biosystems, modelo 3700: sequenciador de alta capacidade baseado em tecnologia capilar no qual o carregamento de amostras é realizado automaticamente a partir de placas em formato de 96 ou 384 poços. A capacidade de sequenciamento é de 7 placas de 96 amostras ou 2 placas de 384 amostras por dia, ou seja, 672 amostras/dia no formato 96 ou 768 amostras/dia no formato 384. Este equipamento é indicado para projetos de sequenciamento em escala nos quais as amostras são fornecidas necessariamente em placas de 96 ou 384 amostras.

A capacidade total da Plataforma operando em cinco dias úteis por semana é de  $1.344 \times 5 = 6.720$  seqüências por semana, ou 26.880 seqüências/mês.

A Plataforma conta ainda com os diversos equipamentos necessários para procedimentos de arranjo de clones em placas de 96 ou 384 poços, minipreparação de DNA plasmidial e computadores para análise de seqüências.

## **10. METODOLOGIAS UTILIZADAS PELA PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO**

A Plataforma utiliza-se dos seguintes kits para sequenciamento: ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1, da Applied Biosystems e da DYEnamic® ET Terminator Matrix Standard, da Amersham Pharmacia Biotech. Como observação, em caso do usuário apenas submeter amostras para a análise eletroforética é importante que o mesmo

utilize-se daqueles acima mencionados, evitando-se assim, a ocorrência de incompatibilidade com a matriz e filtro utilizados nos sequenciadores.

O procedimento de crescimento bacteriano e minipreparação plasmidial é realizado inteiramente em formato de placa de 96 poços. As culturas celulares são crescidas em meio líquido Lurian Bacto, LB, ou Circle Grow, CG, seguindo-se o processo de lise alcalina e purificação com sistema de filtragem Millipore em placas de 96 mediante centrifugação.

O processo de purificação por precipitação do DNA em etanol do produto da reação de PCR antes da análise eletroforética é realizado seguindo as recomendações especificadas para os kits de sequenciamento da Applied e da Amersham.

Os protocolos dos procedimentos utilizados pela Plataforma encontram-se disponibilizados no endereço:

<http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/psd.html>, e devem ser utilizados pelos usuários sempre que necessário.

## **11. SERVIÇOS OFERECIDOS**

A Plataforma oferece diferentes modalidades de serviços de sequenciamento podendo variar em acordo com as necessidades demandadas pelo usuário. Tais serviços são desde a simples eletroforese de produtos de reação de sequenciamento até o um procedimento mais completo, envolvendo o inóculo das colônias bacterianas até a geração das seqüências propriamente ditas. Os valores correspondentes a cada um destes serviços são cobrados de maneira diferenciada e em proporção a sua complexidade. O resultado do sequenciamento fornecido pela plataforma consiste de arquivos eletrônicos constituídos por um eletroferograma e arquivo texto apresentando a seqüência e o resultado da

correspondente análise de qualidade com o software Phred.

### **11.1. Relação dos serviços oferecidos**

#### **11.1. 1. Injeção/carregamento em gel de produto da reação de sequenciamento**

Consiste na realização da análise eletroforética capilar ou em gel de poliacrilamida das amostras submetidas. O usuário submete a amostra na forma de um *pellet* seco proveniente de uma reação de PCR seguida de uma purificação para remoção de nucleotídeos não incorporados e demais impurezas.

A utilização do protocolo de amplificação e purificação encontram-se disponíveis na página da Plataforma. A Plataforma reserva-se no direito de rejeitar toda e qualquer amostra submetida fora das condições especificadas.

#### **11.1.2. Reação de sequenciamento e purificação do DNA**

Consiste na realização da reação de amplificação por PCR, purificação e análise eletroforética capilar ou em gel das amostras. O usuário submete apenas uma amostra de DNA purificada, em concentração devidamente ajustada de acordo com o tipo de DNA molde seguindo as instruções de submissão e recomendações de preparo de amostras descritas na página do Laboratório. A Plataforma fornece os resultados de sequenciamento na forma de um arquivo eletrônico a ser resgatado da Bioinformática mediante senha específica do usuário.

#### **11.1.3. Minipreparação de DNA plasmidial**

Consiste de um procedimento o qual precede a reação de amplificação do sequenciamento, exclusivo de **projetos cuja demanda por sequenciamento seja superior a 480 clones**. Este serviço somente é oferecido para submissão de colônias bacterianas previamente arranjadas em formato de 96.

A minipreparação consiste no inóculo de clones bacterianos para crescimento em meio líquido e posterior extração do DNA plasmidial de colônias crescidas em meio líquido contendo glicerol em formato de placa de 96 poços ou meio sólido. O usuário submete as colônias previamente arranjadas em formato de 96 poços crescendo em meio de cultura.

#### **11.1.4. Arranjo de clones em placa de 96 poços e crescimento celular**

Consiste em um procedimento o qual também precede a amplificação para sequenciamento, exclusivo de **projetos cuja demanda para o sequenciamento seja maior que 9600 clones**. Tal procedimento é executado utilizando-se um sistema robotizado de repicagem de colônias.

## **12. NORMAS DE FUNCIONAMENTO DA PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO**

**12.1. Finalidade:** A Plataforma de Genômica Funcional deverá dedica-se exclusivamente ao sequenciamento em escala de clones de DNA dos diversos projetos da Embrapa ou que contam com a participação da empresa, podendo atender aos usuários externos quando a demanda interna assim permitir.

**12.2. Usuários:** Os serviços oferecidos pela Plataforma podem ser acessados por todos os pesquisadores da Unidade, ou da Embrapa, de acordo com as normas de funcionamento estabelecidas, e a toda a comunidade científica de acordo com contratos específicos ou disponibilidade de tempo e recursos.

**12.3. Gestão:** A Plataforma é gerida por um Comitê Gestor, nomeado pela Chefia da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, o qual tem a responsabilidade de zelar pelo seu funcionamento pleno, pelo atendimento às solicitações dos usuários, pela solução dos problemas técnicos operacionais, pela manutenção dos equipamentos, pelo controle de insumos (reagentes/materiais) dentro das Normas de Funcionamento estabelecidas para a Plataforma. O Comitê Gestor é constituído por pesquisadores da instituição com experiência com as atividades desenvolvidas pela Plataforma, desempenhando as funções de gerenciamento previstas de acordo com a nomeação realizada pela Chefia Geral da Unidade.

**12.4. Operação:** A Plataforma é operacionalizada como uma “linha de produção” onde um técnico de nível superior é responsável pela gerência e administração dos bens, materiais, serviços e pessoal da mesma, coordenado pelo Comitê Gestor, dois técnicos de nível superior e dois técnicos de nível médio, realizam as operações de arranjo de clones, minipreparação de DNA, PCR de DNA purificado e injeção/carregamento de produto da reação de sequenciamento de DNA fornecido pelos usuários.

### **12.5. Espaço Físico**

O espaço físico definido para a Plataforma de Sequenciamento de DNA é de uso exclusivo para prestação de serviços de

sequenciamento e não deve ser confundido com espaço destinado à pesquisa de pesquisadores ou projetos específicos.

Para descaracterizar qualquer possibilidade de utilização da Plataforma de Sequenciamento na pesquisa individual, os escritórios localizados dentro do espaço físico da Plataforma devem ser destinados apenas aos técnicos que atuam no interior da mesma ou à estocagem de materiais e reagentes. Nenhum pesquisador terá escritório no local de funcionamento da Plataforma.

### **12.6. Equipamentos Disponíveis à Plataforma**

Os equipamentos/materiais presentes na Plataforma Genômica são de uso exclusivo para prestação de serviços de sequenciamento e não devem ser confundidos com equipamentos/materiais destinados à pesquisa de pesquisadores ou projetos específicos.

## **13. NORMAS PARA SUBMISSÃO DE AMOSTRAS DE DNA**

Para a utilização dos serviços prestados pela Plataforma Genoma Funcional, o usuário deverá preencher um formulário de submissão das amostras para sequenciamento disponível para resgate eletrônico na página da Plataforma ou no final deste documento. As amostras somente serão recebidas pelo técnico responsável mediante:

1. a apresentação do formulário de submissão devidamente preenchido e assinado;
2. mediante a comprovação de pagamento.

**OBSERVAÇÃO:** As amostras de DNA ou colônias deverão ser entregues ao responsável técnico pelo recebimento até as 12:00 horas. Após este horário não serão recebidas amostras de colônias.

#### 14. RECOMENDAÇÕES PARA PREPARAÇÃO DE DNA MOLDE PARA SEQUENCIAMENTO

**É importante ressaltar que cabe ao usuário toda e qualquer responsabilidade pela qualidade e quantidade das amostras do DNA bem como das condições especificadas em protocolo, em casos especiais, fornecido para a Plataforma.** Em contrapartida, cabe a Plataforma o compromisso de produzir seqüências de alta qualidade.

Entenda-se por “condições especiais” toda e qualquer reação cujos procedimentos envolvidos no processo de sequenciamento apresentem uma metodologia diferenciada daquela utilizada em rotina pela Plataforma para sequenciamento em alta escala. Cabendo a Plataforma apenas o serviço de reprodução dos protocolos já padronizados nos laboratórios de pesquisa de cada projeto. (Exemplo: condições de crescimento, temperatura de anelamento dos primers específicos e etc...).

As principais recomendações da Plataforma na preparação da amostra do DNA molde de maneira a maximizar a probabilidade de sucesso do sequenciamento posterior poderão ser encontradas na página da Plataforma na internet. **Também é importante ressaltar que cabe ao usuário o pagamento correspondente ao número de amostras submetidas para sequenciamento e não ao número de amostras seqüenciadas com sucesso.** Assim sendo, caso o usuário tenha suspeita da existência de algum problema referente a amostra de DNA submetido ou, ainda, utiliza-se de um protocolo em desenvolvimento de preparação de DNA o qual não tenha sido extensivamente validado, ou utiliza-se de um primer não testado para sequenciamento, sugere-se que inicialmente, apenas algumas amostras sejam submetidas para sequenciamento na validação da qualidade de preparação do DNA, e, somente após definido o

protocolo submeta-se um maior número de amostras.

Para uma maior segurança sugere-se que o usuário submeta sempre uma ou mais amostras controle, previamente seqüenciadas, as quais auxiliam significativamente no estabelecimento das condições das reações e na comparação de resultados oriundos de diferentes procedimentos.

A Plataforma recomenda ao usuário uma precisa análise qualitativa e quantitativa da amostra de DNA a ser submetida para sequenciamento. A avaliação pode ser realizada em gel de agarose por eletroforese bem como por espectrofotometria. A análise eletroforética do material em gel de agarose deve produzir apenas um fragmento correspondente ao mesmo e na análise espectrofotométrica as leituras obtidas nas O.D.260/280 deverão apresentar-se dentro da faixa de 1,8 e 2,0.

#### 15. PREÇOS DOS SERVIÇOS

A Plataforma Genoma Funcional tem seus serviços subsidiados pela Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia, não incluindo em seus custos as despesas referentes à mão-de-obra especializada, encargos sociais, eletricidade, água, etc. A tabela de custo, apresentada no Manual do Usuário da Plataforma Genoma Funcional, demonstra os preços de serviço de sequenciamento levantados em todo o mundo possibilitando ao usuário comparar o impacto deste subsídio sobre os custos para sua pesquisa. A Tabela 1 apresenta a relação dos preços, em dólar, correspondentes aos serviços realizados pela Plataforma. Para efetuar o pagamento, os valores dos orçamentos referentes aos serviços devem ser convertidos para a moeda em vigência no país, na taxa de câmbio fornecida pelo Banco Central do Brasil, na data de submissão do formulário de solicitação de sequenciamento de amostras de DNA.

**Tabela 1.** Relação dos preços referentes aos serviços prestados pela Plataforma de Sequenciamento de DNA para usuários internos.

Plataforma 3700 (submissão em placas)	Preço em US\$
Arranjo de clones em placa de 96 poços	6,60
Crescimento e minipreparação de DNA plasmidial	32,75
Reação de sequenciamento e purificação de DNA	59,16
Injeção para Sequenciamento no ABI 3700	23,22
Manutenção e depreciação de equipamentos	59,22
Taxa de garantia dos padrões mínimos de qualidade	27,15
<b>Preço por placa seqüenciada</b>	<b>208,10</b>

OBS: entenda-se por usuário interno todo aquele usuário funcionário ou não da EMBRAPA o qual esteja ligado a um projeto desenvolvido por esta empresa. Para os usuários externos ou aqueles que se utilizam dos serviços da Plataforma sem qualquer vínculo empregatício ou de pesquisa em cooperação com a EMBRAPA ao valor estipulado na Tabela 1 é acrescido o correspondente a contrapartida da empresa correspondente a US\$ 22,32.

Os preços da Tabela 1 são estabelecidos em dólar, uma vez que os custos dos reagentes e suprimentos utilizados para a execução completa do processo de sequenciamento tem sua cotação no valor desta moeda na importação.

## 15. O PAGAMENTO DOS SERVIÇOS

O serviço deverá ser pago de forma adiantada no momento de submissão das amostras para sequenciamento. O pagamento poderá ser realizado das seguintes maneiras:

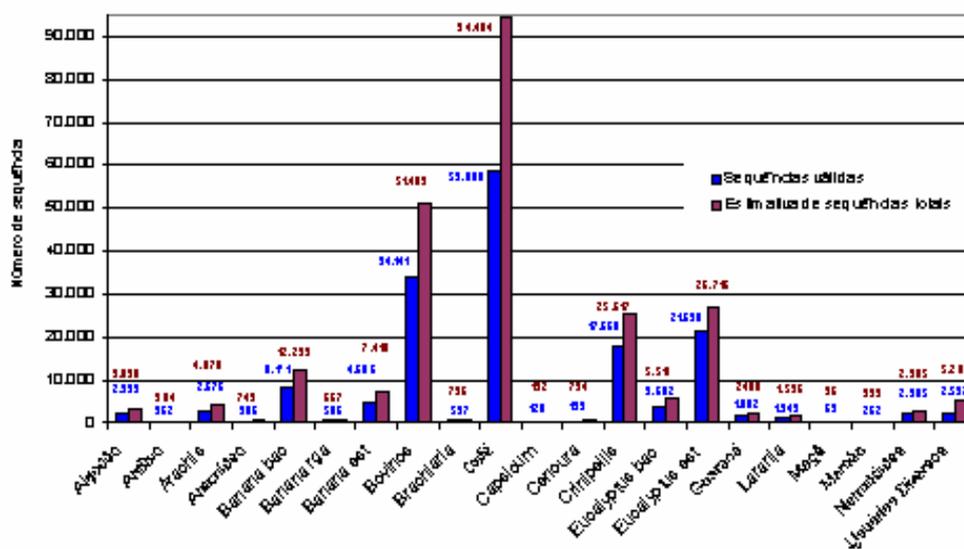
**16.1. Pagamento em dinheiro (esta modalidade de pagamento não foi viabilizada até a presente data):** o usuário deverá depositar o valor a ser informado pelo gerente da Plataforma, em moeda corrente, na conta corrente indicada pelo Comitê Gestor da Plataforma. Confirmado o depósito, fica a

Embrapa responsável pelo fornecimento da nota fiscal pela eventual prestação de serviços em nome do usuário e/ou projeto específico em acordo com os dados apresentados no formulário de submissão de amostras.

**16.2. Pagamento em reagentes e/ou suprimentos:** é a forma de pagamento mais utilizada, neste caso, o usuário deverá adquirir reagentes e suprimentos seguindo instruções específicas do gerente ou administrador da Plataforma. O material solicitado deverá ser enviado à Plataforma, juntamente com a nota fiscal, antes da data de submissão das amostras com entrega prevista diretamente à Plataforma. No caso de importação, fica o usuário encarregado de apresentar no momento da submissão das amostras a proposta de compra emitida pela empresa fornecedora especificando a data prevista de entrega.

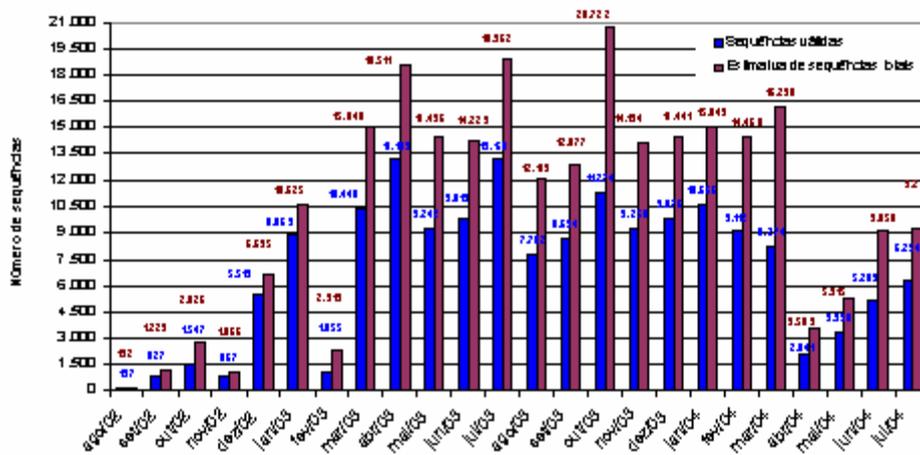
## 17. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA PLATAFORMA

Durante o período de 19 de agosto de 2002 a 21 de junho de 2004 foram sequenciadas 2.326 placas formato 96, correspondente a 223.296 reações referentes a diversos projetos, totalizando 156.146 seqüências válidas. Neste período a média mensal de sequenciamento gerou aproximadamente 7.000 seqüências válidas como mostrado na Figura 1 (BARBOSA, 2000; GOMES, 2000; GRIFFITHS et al., 1988).



**Figura 1.** Seqüências produzidas pela Plataforma Genoma Funcional. Histograma apresentado os resultados obtidos dos sequenciamentos envolvendo os diversos usuários da Plataforma no período de agosto de 2002 à julho de 2004. Em azul as barras representando as seqüências válidas e em marron as barras correspondentes às seqüências totais.

Os dados relativos às seqüências válidas e estimativas produzidas mensalmente na Plataforma Genoma Funcional encontram-se na Figura 2.



**Figura 2.** Seqüências produzidas pela Plataforma Genoma Funcional. Histograma apresentado os resultados obtidos dos sequenciamentos envolvendo as seqüências válidas no período de agosto de 2002 à julho de 2004. Em azul as barras representando as seqüências válidas e em marron as barras correspondentes às seqüências totais.

## 18. EQUIPAMENTO DE MICRO-ARRANJO

No período de 19 a 21 de novembro de 2003, um parecer técnico da Amersham Biosciences, José Henrique Aizawa, foi emitido informando sobre a perfeita condição do equipamento de micro-arranjo e a viabilidade de uso do mesmo.

## 19. TREINAMENTO PARA UTILIZAÇÃO DO Q-BOT

O treinamento técnico para a utilização do Q-Bot foi realizado no período de 07 a 09 de junho de 2004, tendo como participantes os técnicos Carlos R. Borges Neto e Edmilson Martins de Oliveira e os assistentes de operação Adauto da Silva Castro e Luciana Beatriz Dutra Labuto. Dentre os recursos do equipamento foram treinamento para a execução das seguintes funções do robô de replicação: a) réplica de placas; b) rearranjo de clones em placas; c) montagem de membranas e d) arranjo de colônias.

Atualmente este também constitui um serviço prestado pela Plataforma.

## 20. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E METODOLÓGICAS

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os artigos, resumos, comunicados e circulares técnicas que elaborados pelos Técnicos, Assistentes e estagiários da Plataforma de Sequenciamento de DNA até o ano de 2004.

**Tabela 3.** Comunicados e Circulares Técnicas publicados pelos Técnicos, Assistentes e estagiários da Plataforma de Sequenciamento de DNA.

Ano	Comunicados e Circulares Técnicas
2003	FERREIRA, M. E.; BORGES NETO, C. R. <b>A importância da pesquisa genômica e o sequenciamento de DNA.</b> Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 91).
2003	LABUTO, L. B. D.; LOPES, J. M. P.; SOUSA, Z. A. R.; ANDRADE, V. N.; BORGES NETO, C. R. <b>Protocolos otimizados para arranjos de clones e minipreparação de DNA.</b> Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 23).
2003	FIGUEIREDO, G. S. F.; REIS, A. C. M.; CASTRO, A. S.; BISOL, T. B.; BORGES NETO, C. R. <b>Reação de sequenciamento de DNA e purificação - Protocolos otimizados.</b> Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 22).

**Tabela 4.** Resumos apresentados em eventos elaborados pelos Técnicos, Assistentes e estagiários da Plataforma de Sequenciamento de DNA.

Ano	Trabalhos apresentados
2003	LABUTO, L. B. D.; LOPES, J. M. P.; SOUSA, Z. A. R.; ANDRADE, V. N.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>Arranjo de clones e minipreparação de DNA - Protocolos otimizados.</b> In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 8., 2003, Brasília, Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 30.
2003	CASTRO, A. S.; BISOL, T. B.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>Protocolo otimizado da reação de sequenciamento de DNA.</b> In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 8., 2003, Brasília, Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 48.
2003	FIGUEIREDO, G. S. F.; REIS, A. C. M., CASTRO, A. S.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>Purificação e sequenciamento de DNA - protocolos otimizados.</b> In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 8., 2003, Brasília, Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 49.

**Tabela 5.** Artigos de divulgação na mídia elaborados pelos Técnicos, Assistentes e estagiários da Plataforma de Sequenciamento de DNA.

Ano	Artigos científicos
2003	FERREIRA, M. E.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>A importância da pesquisa genômica e o sequenciamento de DNA.</b> Disponível em: < <a href="http://www.ruralnet.com.br">www.ruralnet.com.br</a> , <a href="http://www.boletimpecuario.com.br">www.boletimpecuario.com.br</a> e <a href="http://www.agronet.com.br">www.agronet.com.br</a> >. Acesso em: 19 dez. 2003.
2003	LABUTO, L. B. D.; LOPES, J. M. P.; SOUSA, Z. A. R.; ANDRADE, V. N.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>Arranjo de clones e minipreparação de DNA - Protocolos otimizados.</b> Disponível em: < <a href="http://www.ruralnet.com.br">www.ruralnet.com.br</a> , <a href="http://www.boletimpecuario.com.br">www.boletimpecuario.com.br</a> e <a href="http://www.agronet.com.br">www.agronet.com.br</a> >. Acesso em: 19 dez. 2003.
2003	FIGUEIREDO G. S. F.; REIS, A. C. M.; CASTRO, A. S.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>Purificação e sequenciamento de DNA - Protocolos otimizados.</b> Disponível em: < <a href="http://www.ruralnet.com.br">www.ruralnet.com.br</a> , <a href="http://www.boletimpecuario.com.br">www.boletimpecuario.com.br</a> e <a href="http://www.agronet.com.br">www.agronet.com.br</a> >. Acesso em: 19 dez. 2003.
2003	CASTRO, A. S.; BISOL, T. B.; <u>BORGES NETO, C. R.</u> <b>Protocolo otimizado da reação de sequenciamento de DNA.</b> Disponível em: < <a href="http://www.ruralnet.com.br">www.ruralnet.com.br</a> e <a href="http://www.boletimpecuario.com.br">www.boletimpecuario.com.br</a> >. Acesso em: 19 dez. 2003.

## 21. CURSOS E TREINAMENTO DOS TÉCNICOS E ASSISTENTES

A tabela 6 apresenta a relação dos cursos e treinamentos aos quais os técnicos e assistentes da Plataforma foram submetidos até o ano de 2004.

**Tabela 6.** Treinamentos e cursos realizados pelos Técnicos e Assistentes da Plataforma de Sequenciamento de DNA.

Ano	Duração (horas)	Cursos ou Treinamentos / Entidades
2003	20	Treinamento Básico de Sequenciamento de DNA na Plataforma ABI Prism 3700. Brasília-DF, 18 a 20 de março. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Applied Biosystem do Brasil Ltda.
2002	36	Treinamento Básico de Sequenciamento de DNA na Plataforma ABI Prism 3100. Brasília-DF, 26 a 30 de agosto. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Applied Biosystem do Brasil Ltda.
2002	34	Programa de Capacitação do Período Probatório. Brasília-DF, 18 a 23 de agosto. EMBRAPA Sede.
2002	40	Treinamento Básico de Sequenciamento de DNA. Cordeirópolis –SP, 06 a 10 de agosto. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira” do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC.

#### Referências Bibliográficas

ARABDOPSIS Genome Initiative. Analysis of genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796-815, Dec. 2000.

BARBOSA, J. C. **Estatística experimental**. São Paulo: FCAV-UNESP, 2000. 283 p.

BONATO, M. C. M. **Tecnologia do DNA recombinante**. Disponível em: <<http://www.biologianaweb.com/Livro2/Moldes.htm>>. Acesso em: out. 2003.

BOROVNIK, C. L.; TAJARA, E. H.; ROCHA, J. C.; FARAH, L. M. S.; NACCACHE, N. F.; NETTO, R. C. M.; JOFFE, R. **Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana**. Disponível em: <<http://www.sbg.org.br/>>. Acesso em: out. 2003.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**. 4. ed. São Paulo: Artmed Editora. 2003. 376 p.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. **Imunologia básica**. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas, 1989.

CASTRO, A. S.; BISOL, T. B.; BORGES NETO, C. R. **Protocolo otimizado da reação de sequenciamento de DNA**. Disponível em: <<http://www.ruralnet.com.br/artigos>>. Acesso em: 2004.

CHILDREN'S HOSPITAL OAKLAND RESEARCH INSTITUTE. **Vector ptarbac 1.3 information map**. Disponível em: <<http://bacpac.chori.org/ptarbac13.htm>>. Acesso em: mar. 2004.

CRUZ, A. K.; ESPREAFICO, E. M.; ROSSI, N. M. M.; LARSON, M. L. P.; TOSI, L. R. O. **Genética molecular e tecnologia do DNA recombinante**. 2001. Disponível em: <<http://morpheus.fmrp.usp.br/td/index.php>>. Acesso em: mar. 2004.

EGGEN, A. L.; HAYES, H.; LAURENT, P.; URBAN, C.; PFISTER-GENSKOW, M.; EILERTSEN, K.; BISHOP, M. **Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage**. 2001. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/articles/pdf/>>. Acesso em: mar. 2004.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS e BIOTECNOLOGIA. **Genoma**. 2003a. Disponível em: <<http://genoma.cenargen.embrapa.br/genoma>>. Acesso em: out. 2003.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS e BIOTECNOLOGIA. **Plataforma de sequenciamento de DNA**. 2001. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/pd.html>>. Acesso em: out. 2003.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS e BIOTECNOLOGIA. **Protocolo**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/psd/pd/rotocol1.htm>>. Acesso em: out. 2003b.

EWING B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186-194, 1998.

GOMES, F. P. **Os testes ou provas de significância:** teste de Tukey. In: CURSO de Estatística Experimental. 14. ed. São Paulo: Ed. Degaspari, 2000. p. 26 – 29.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, H. J.; SUKUZU, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Tecnologia do DNA recombinante.** In: INTRODUÇÃO à Genética. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1988. p. 399-467.

HORAN, K.; LAURICHA, J.; BAILEY-SRRES, J.; RAIKNEL, N.; GIRKE, T. A sequence family platform for Arabidopsis and rice genome cluster database. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, n. 1, p. 47-54, may 2005.

MARGOLIS, R. L.; RUDNICKI, D. D.; HOLMES, S. E. Huntigton's disease like-2: review an update. **Acta Neurology of Taiwan**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2005.

STURTEVANT, A. H. The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila, as shown by their mode of association. **Journal of the Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 14, p. 43-59, 1913.

<p><b>Comunicado Técnico, 121</b></p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4700 Fax: (61) 340-3666 <a href="http://www.cenargen.embrapa.br">http://www.cenargen.embrapa.br</a> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2004): 150 unidades</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p><b>Presidente:</b> <i>Maria Isabel de Oliveira Penteado</i> <b>Secretário-Executivo:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i> <b>Membros:</b> Arthur da Silva Mariante Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteado Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos Carneiro <b>Supervisor editorial:</b> <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i> Normalização Bibliográfica: <i>Maria Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado</i> <b>Editoração eletrônica:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p>
--	--	--	---