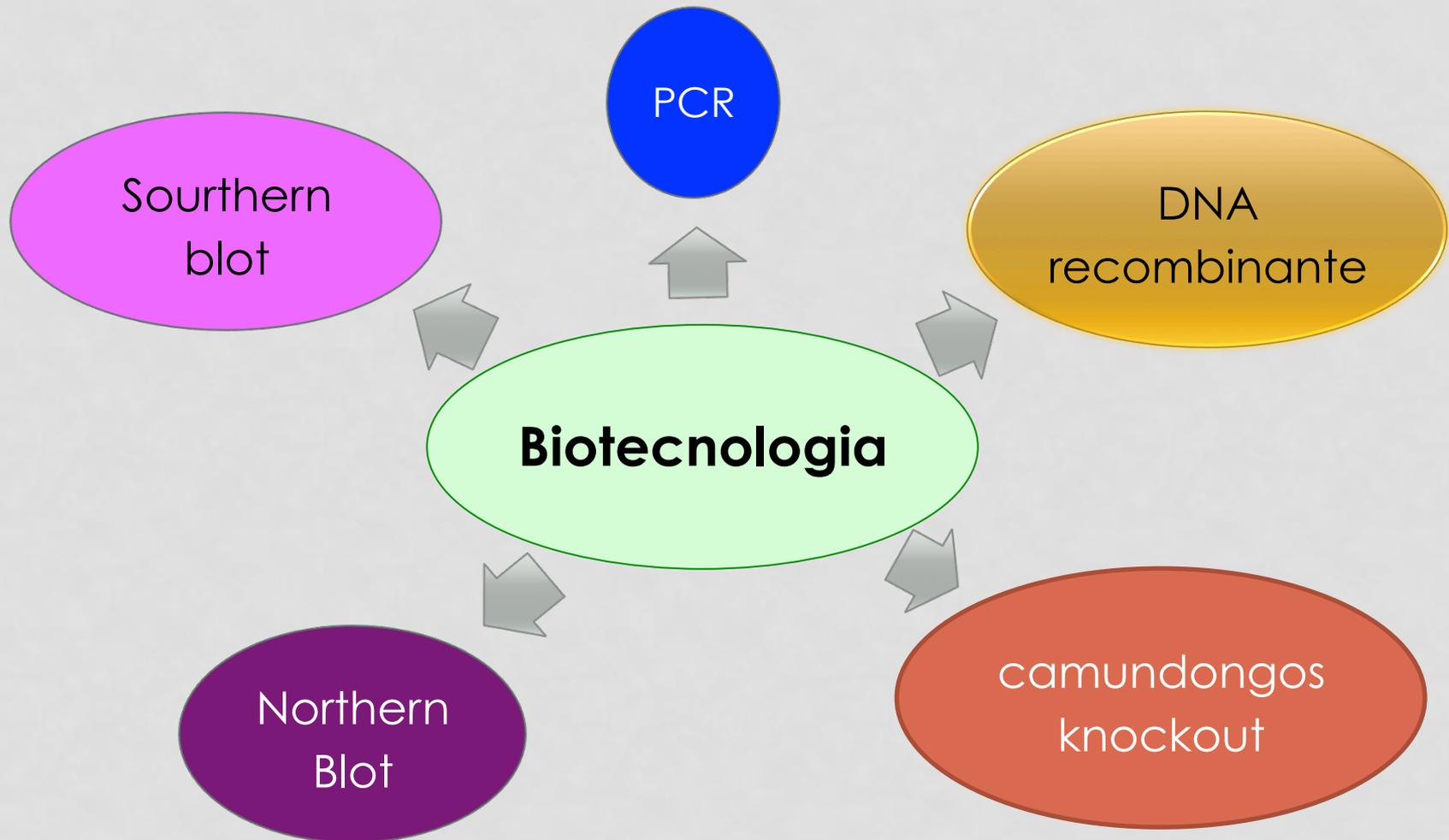


BIOTECNOLOGIA

APARECIDA MARIA FONTES

13 de Março de 2017

BIOTECNOLOGIA E TÉCNICAS ASSOCIADAS



DEFINIÇÕES

Como definir Biotecnologia?

- ❑ Uso de processos biológicos, particularmente genética molecular e tecnologia do DNA recombinante para gerar produtos com valor comercial.

O que é PCR?

- ❑ **PCR:** Técnica de laboratório utilizada para realizar muitas cópias de um segmento de DNA.

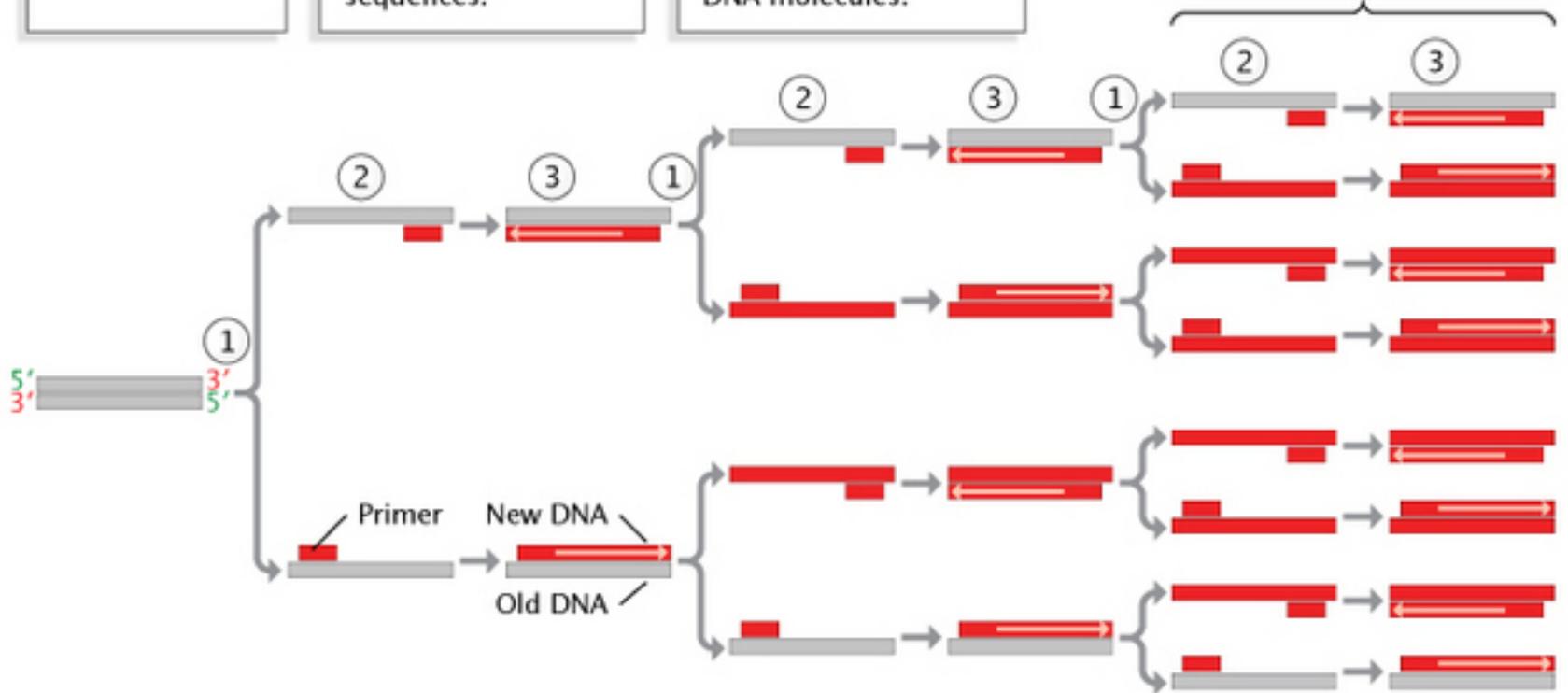
COMO FUNCIONA PCR?

① DNA is heated to 90°-100°C to separate the two strands.

② The DNA is quickly cooled to 30°-65°C to allow short single-strand primers to anneal to their complementary sequences.

③ The solution is heated to 60°-70°C; DNA polymerase synthesizes new DNA strands, creating two new, double-stranded DNA molecules.

The entire cycle is repeated. Each time the cycle is repeated, the amount of target DNA doubles.



NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA DUPLA-FITA AO LONGO DE 30 CICLOS

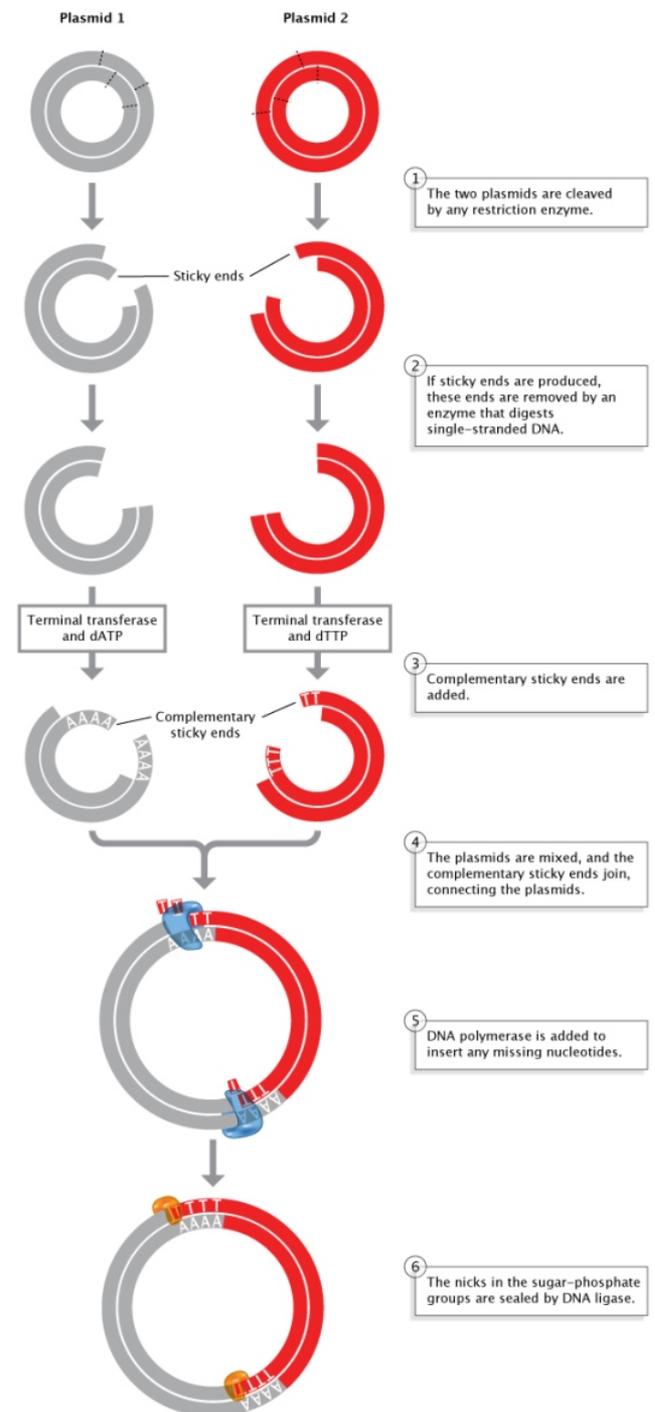
Number of PCR cycles (n)	Number of double-stranded copies of original DNA (2^n)
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
20	1,048,576
30	1,073,741,824

DEFINIÇÕES

O Que é DNA recombinante?

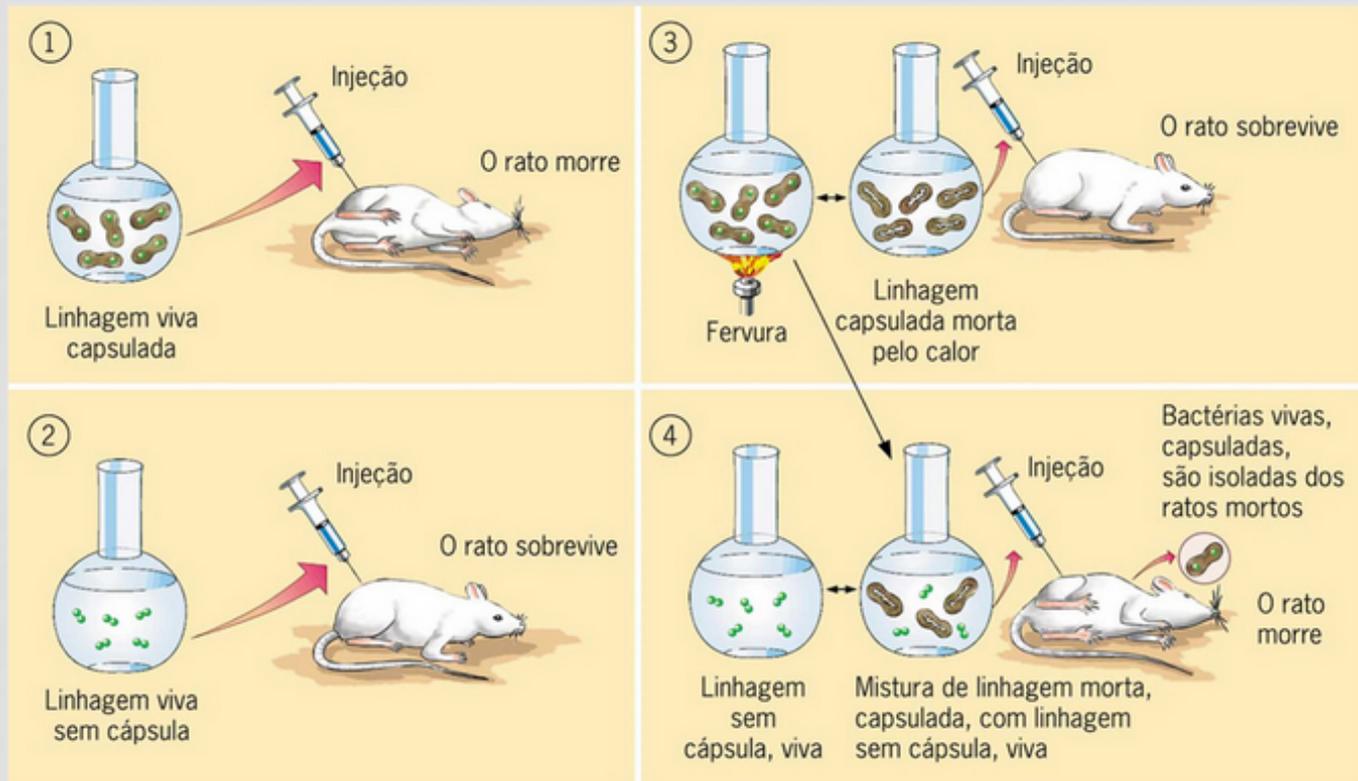
- ❑ Um tipo de sequência de DNA composta por sequências de duas ou mais diferentes origens ou organismos, tais como, humano, camundongo, sequências sintéticas, microorganismos. Esse DNA “customizado” é inserido no genoma de determinada célula com uma proposta específica.

CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO RECOMBINANTE



Quais as 4 principais descobertas científicas que conduziram o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante?

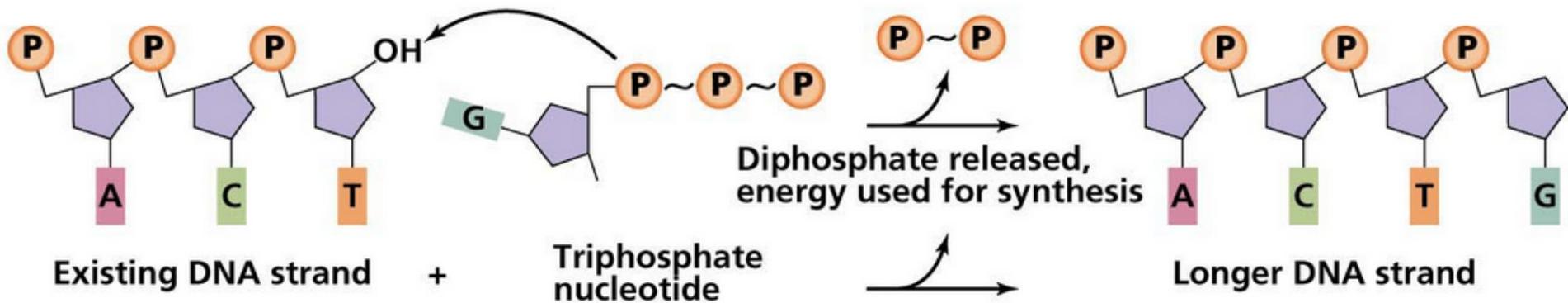
- ❑ 1. 1928 – Frederick Griffith – estudou a transformação genética entre cepas de bactérias causadoras de pneumonia – *Streptococcus pneumoniae*.



Quais as 4 principais descobertas científicas que conduziram o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante?

- ❑ **2. 1969** – Martin Gellert – Descoberta da enzima DNA ligase.

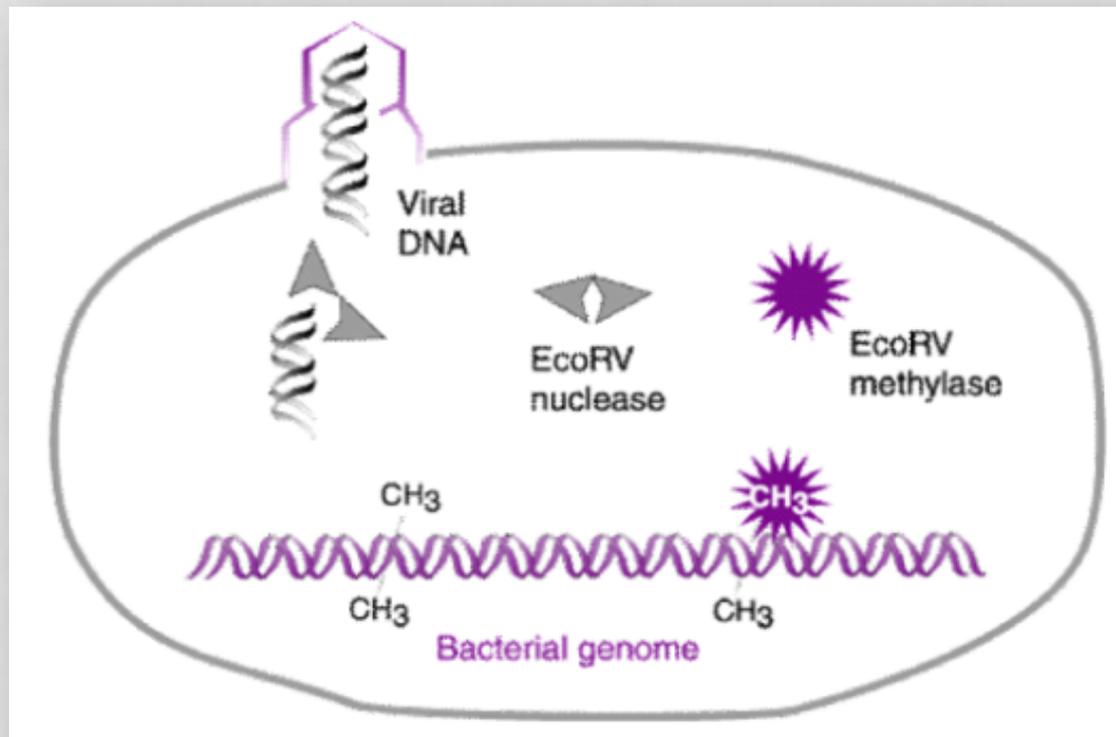
Enzima responsável de formar a ligação 3'-5'-fosfodiéster entre o fosfato 5' de um nucleotídeo no fragmento de DNA eo o 3'-OH no último nucleotídeo do fragmento adjacente



Quais as 4 principais descobertas científicas que conduziram o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante?

- ❑ 3. 1969 – Werner Arber – Descoberta das enzimas de restrição.

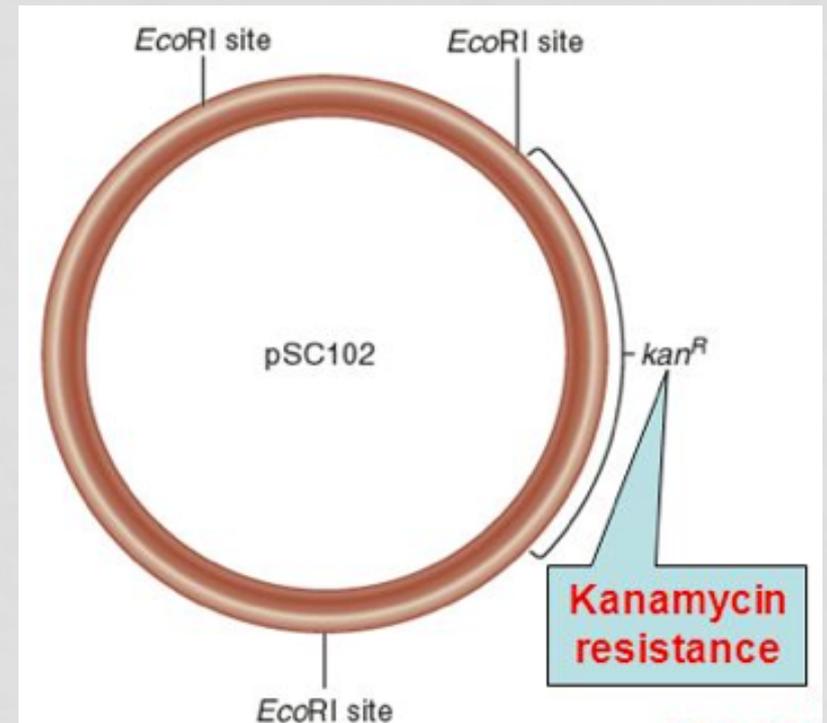
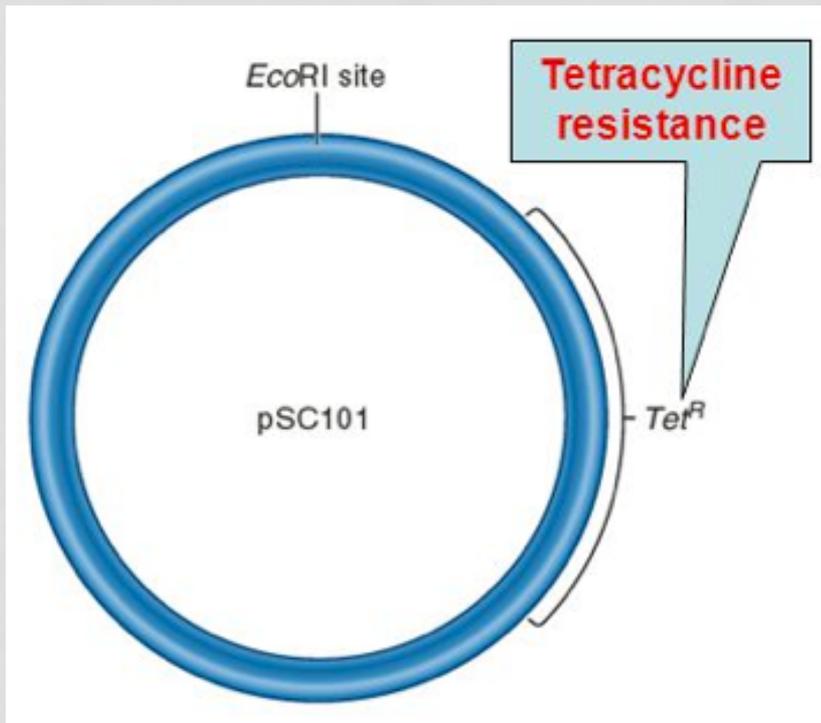
Enzima responsável pela defesa da célula bacteriana contra a invasão pelo bacteriófago.



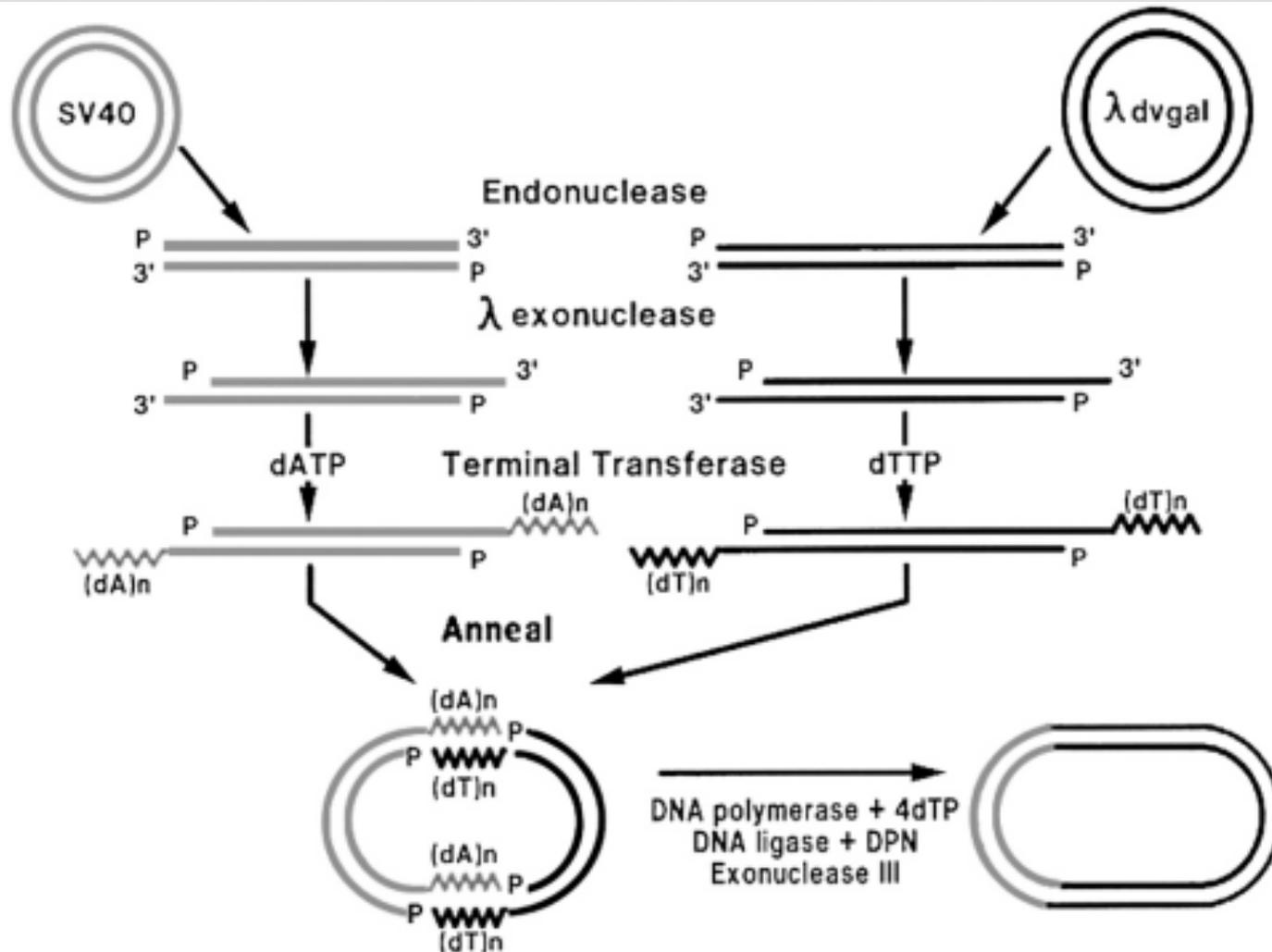
Quais as 4 principais descobertas científicas que conduziram o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante?

- ❑ 4. 1969 – Stanley Cohen – Descoberta do DNA plasmidial.

Inicialmente descrito como fator resistente a antibiótico ou plasmídeo fator-R que replicava em *E. coli* independente do DNA genômico



1972 - A PRIMEIRA MOLÉCULA DE DNA RECOMBINANTE

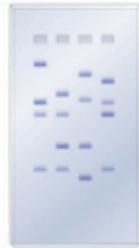


DEFINIÇÕES

O que é Southern blot?

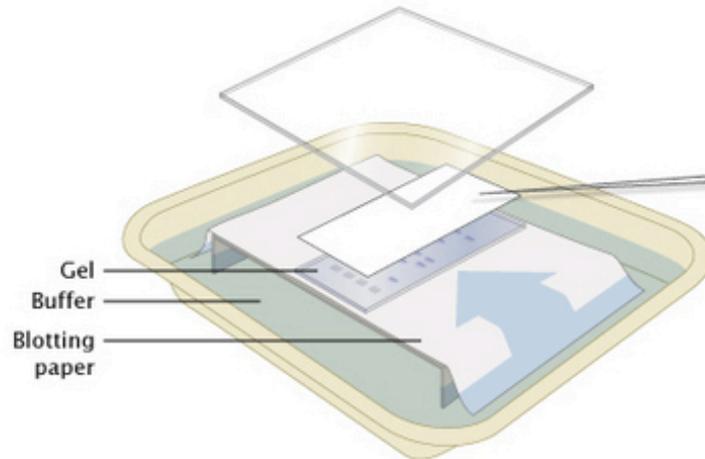
- ❑ Método de laboratório utilizado para detectar moléculas específicas de DNA a partir de uma mistura de moléculas de DNA.

SOUTHERN BLOT: PASSOS 1 A 5

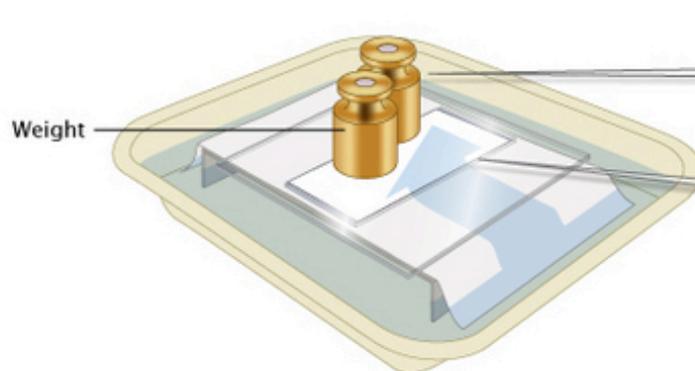


1 DNA is cleaved by restriction enzymes and transferred to an agarose gel. The fragments are separated by gel electrophoresis.

2 The gel is soaked in an alkali solution to denature the double-stranded DNA.



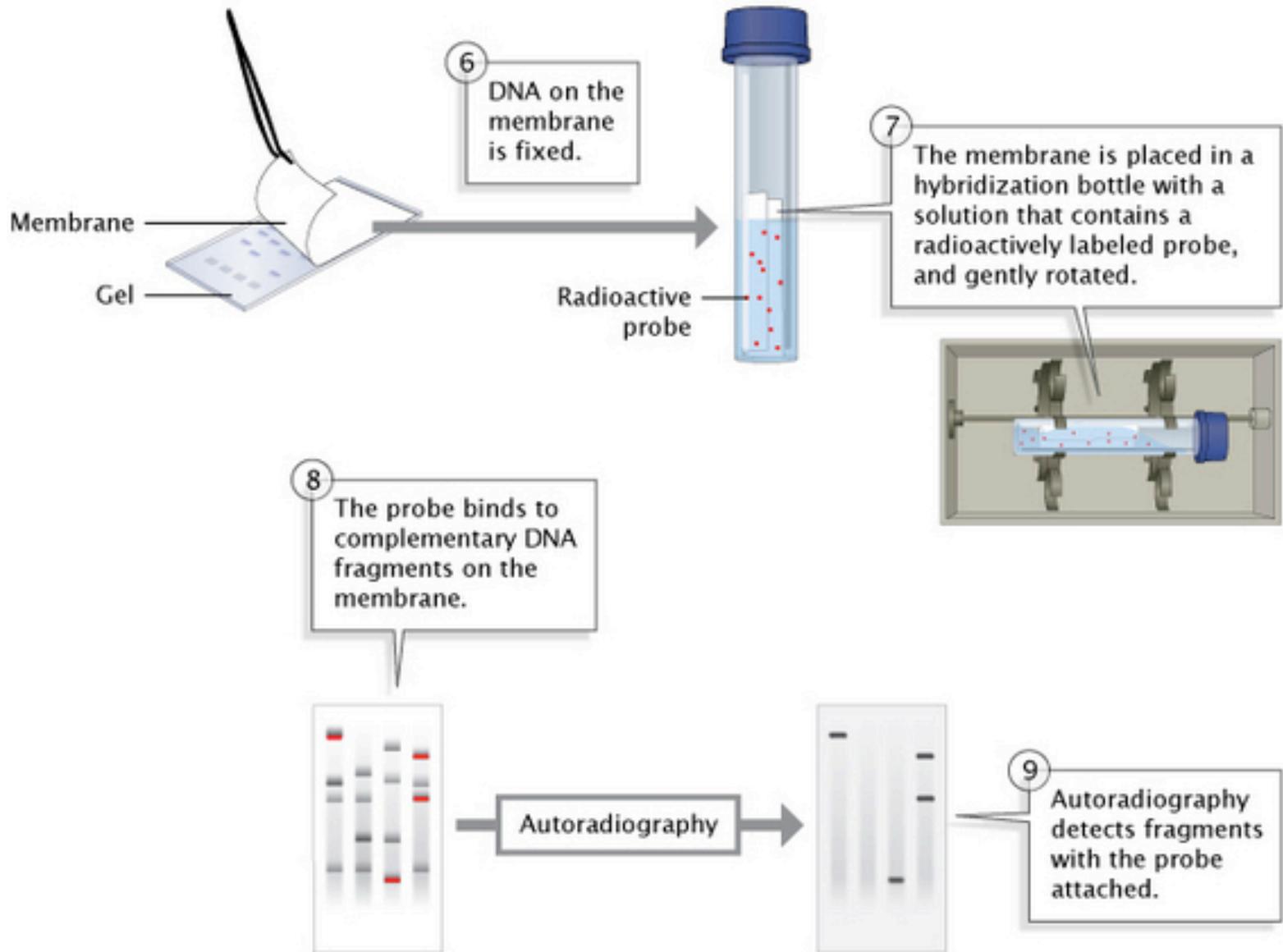
3 A membrane is positioned on top of the gel.



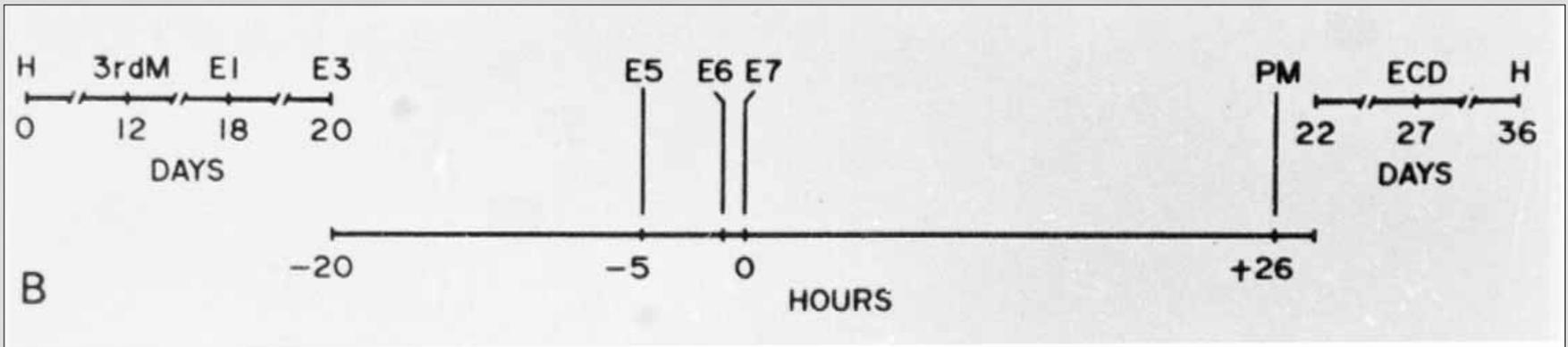
4 Weight is placed on top of the membrane.

5 DNA is carried onto the membrane as the buffer is drawn up through the gel.

SOUTHERN BLOT: PASSOS 6 A 9

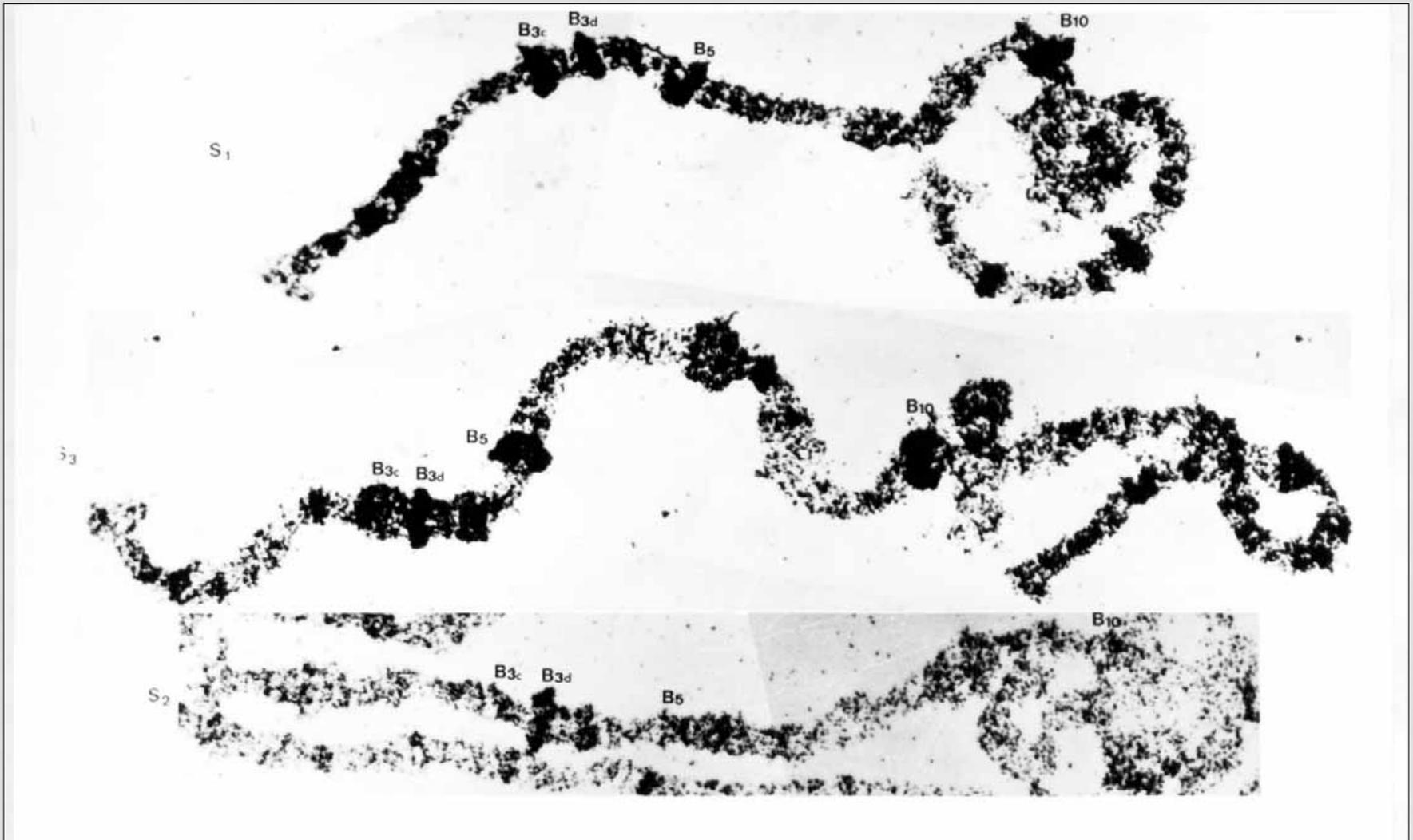


SOUTHERN BLOT: *Bradysia hygida* Pufe de DNA – B10

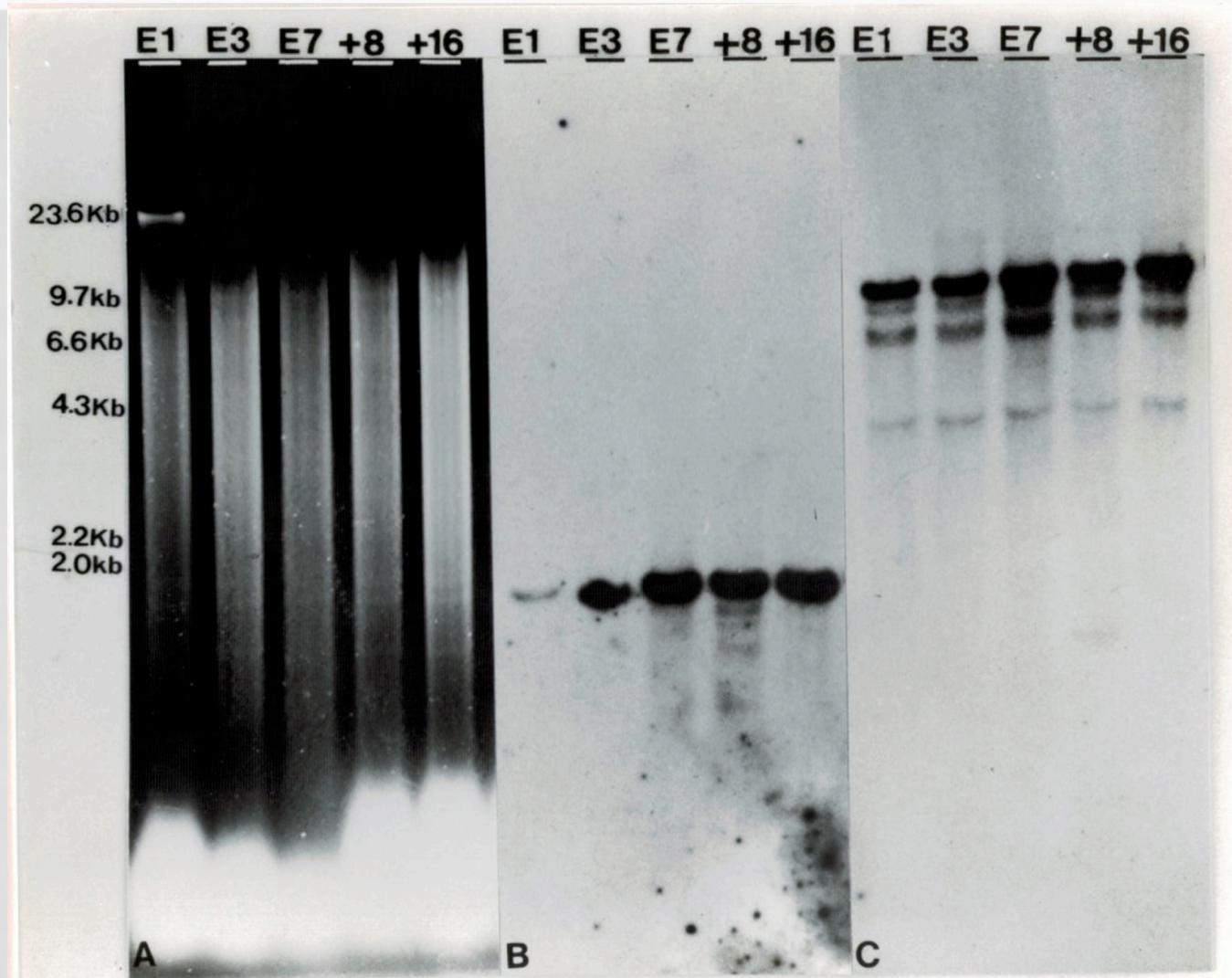


SOUTHERN BLOT: *Bradysia hygida*

Pufe de DNA – B10



SOUTHERN BLOT: *Bradysia hygida* Pufe de DNA – B10



O que significa o rastro de DNA após a coloração com brometo de etídeo do DNA genômico submetido a digestão com enzima de restrição?

DNA degradado?

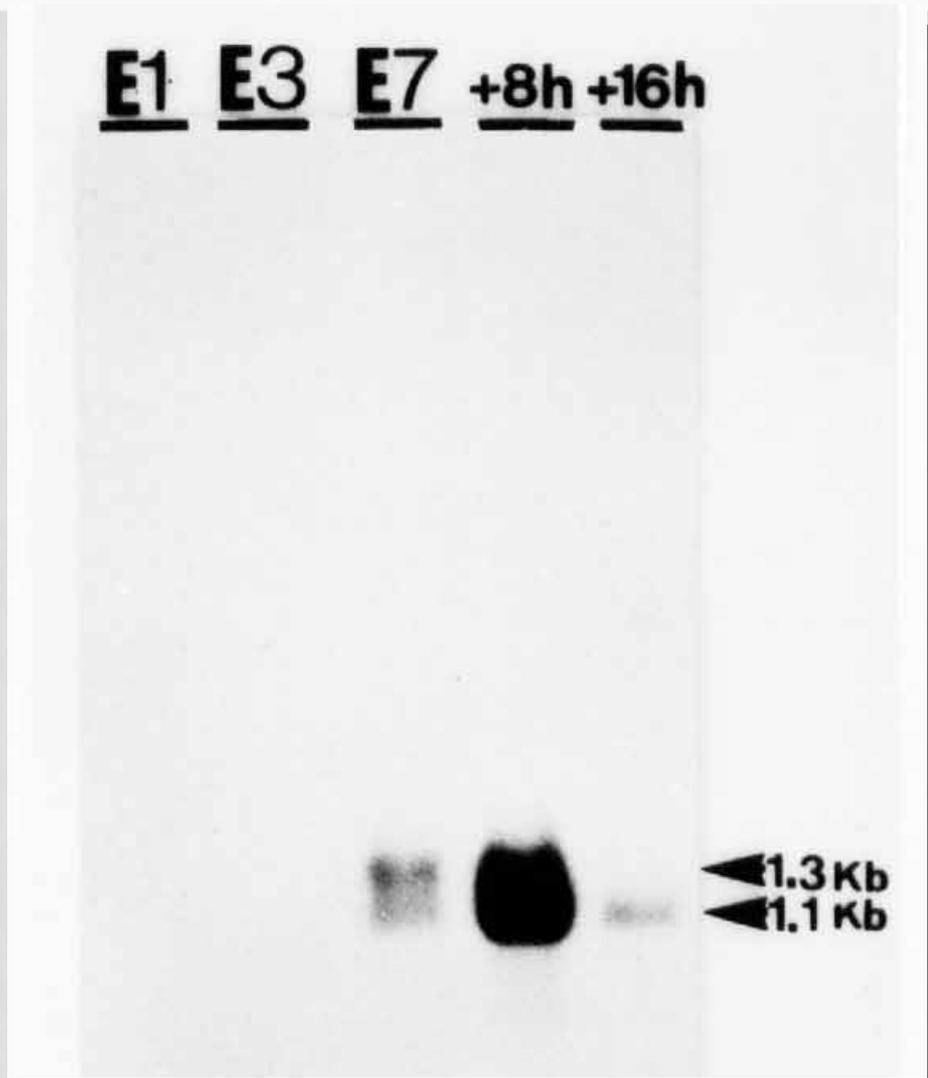
- O número de fragmentos de DNA é muito grande e de tamanho muito aproximado de modo que é visualizado após a eletroforese em gel de agarose como uma mancha, do maior ao menor fragmento.

DEFINIÇÕES

O Que é Northern blot?

- Método de laboratório utilizado para detectar moléculas específicas de RNA a partir de uma mistura de moléculas de RNA.
- Pode ser utilizado para medir o nível de expressão de determinado RNAm.

NORTHERN BLOT: *Bradysia hygida*
Pufe de DNA – B10



DEFINIÇÕES

O que é Camundongo *knockout*?

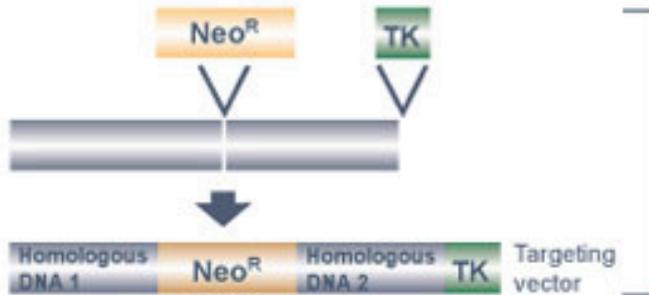
- Camundongo geneticamente modificado para “desligar” determinado gene e identificar a função do mesmo.
- Camundongos *knockouts* são frequentemente utilizados para estudar uma determinada doença humana.

CAMUNDONGO KNOCKOUT:

Passos 1 e 2

Step 1: Designing the targeting vector

Homologous DNA 1 Target gene Homologous DNA 2 Target gene & flanking sequences

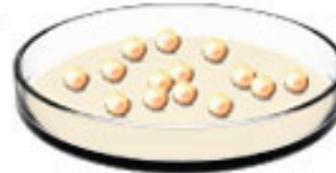


The markers Neo^R and TK are inserted into the target gene sequence to make a targeting vector sequence.

Step 2: Inserting the targeting vector into ES cells

Homologous DNA 1 Neo^R Homologous DNA 2 TK Targeting vector

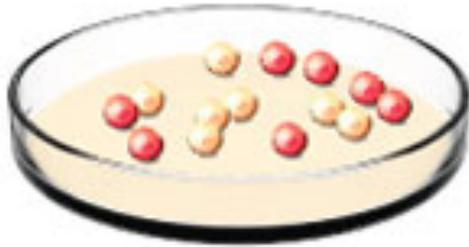
The targeting vector is inserted into ES cells via electroporation.



CAMUNDONGO KNOCKOUT:

Passos 3 e 4

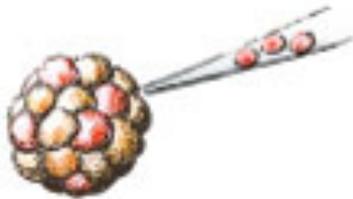
Step 3: Selecting cells



Only the cells that have successfully incorporated the targeting vector into the target gene survive in the presence of neomycin and ganciclovir (shown in red).



Step 4: Injecting cells into a new embryo



Cells containing the targeting vector are then selected and injected into a normal developing mouse embryo.

CAMUNDONGO KNOCKOUT: *Passo final*

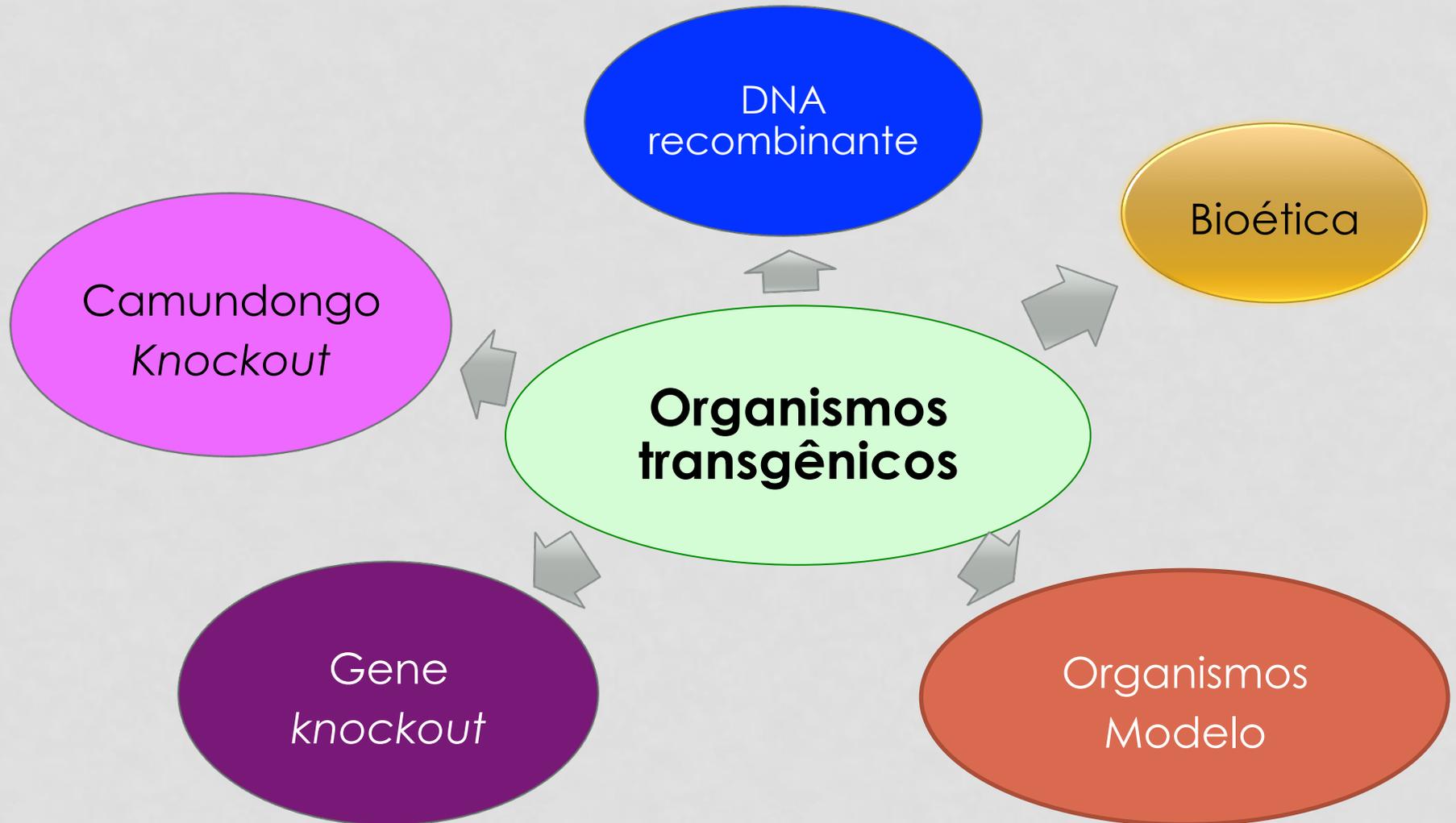
Step 5: Breeding



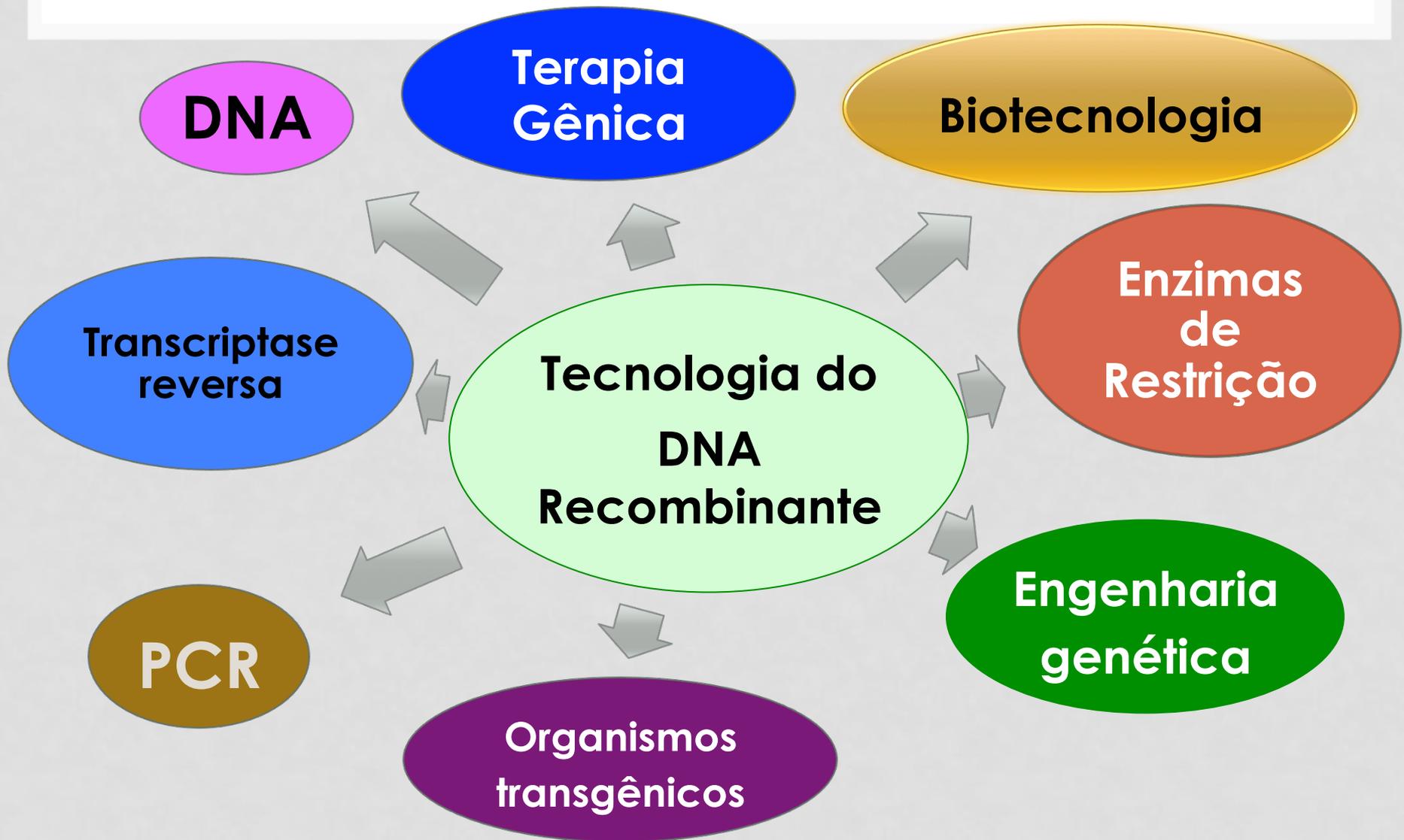
The resulting chimeric (spotted) mouse contains a mix of its own cells and the heterozygous knockout cells. This mouse is bred with a normal (white) mouse.

Among their offspring are mice that are capable of passing the knocked-out gene to their own offspring.

Um camundongo *knockout* é um organismo transgênico?

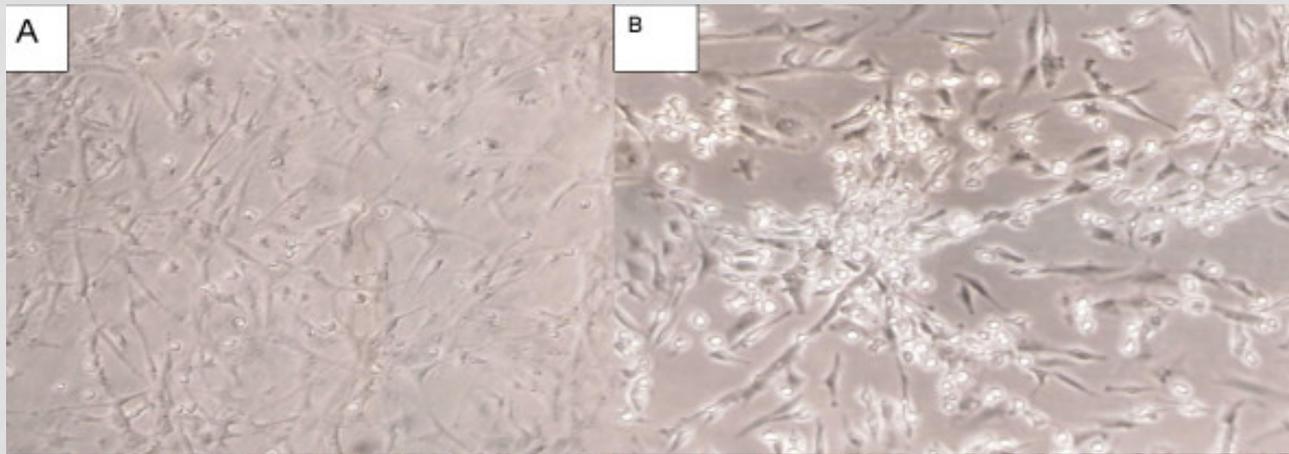
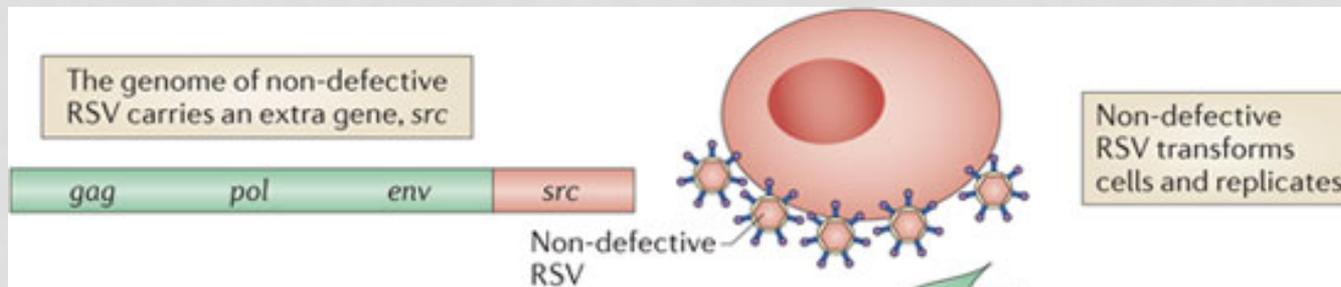


Quais os principais conceitos associados com a Tecnologia do DNA recombinante?



Qual foi a descoberta que permitiu a clonagem e expressão de genes produzindo as proteínas recombinantes?

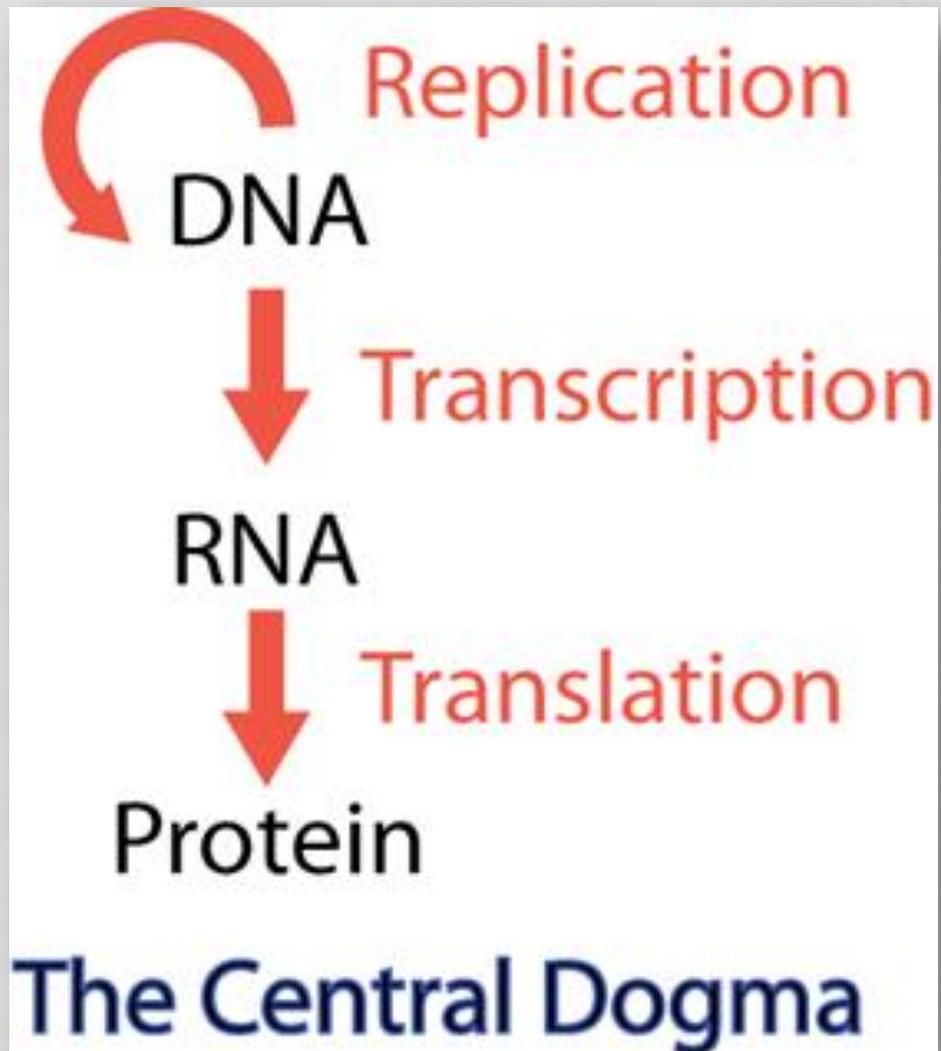
Como os virus de RNA transformam células saudáveis em células tumorais?



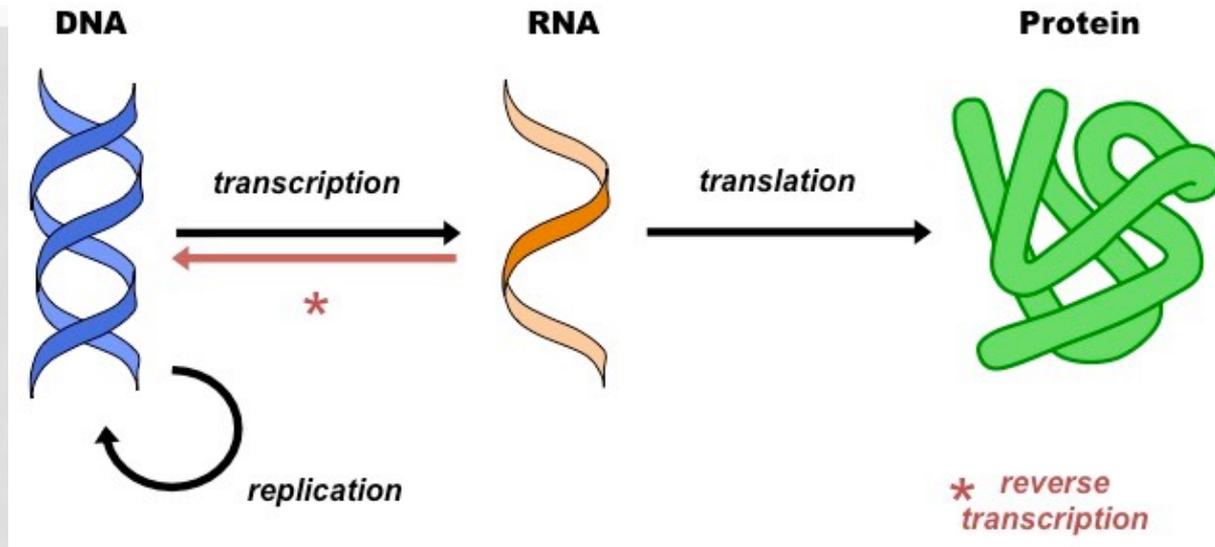
❑ 1970 – Hipótese do Dogma Central Reverso.

Qual o Dogma Central da Genética Molecular?

□ 1958 – Francis Crick.



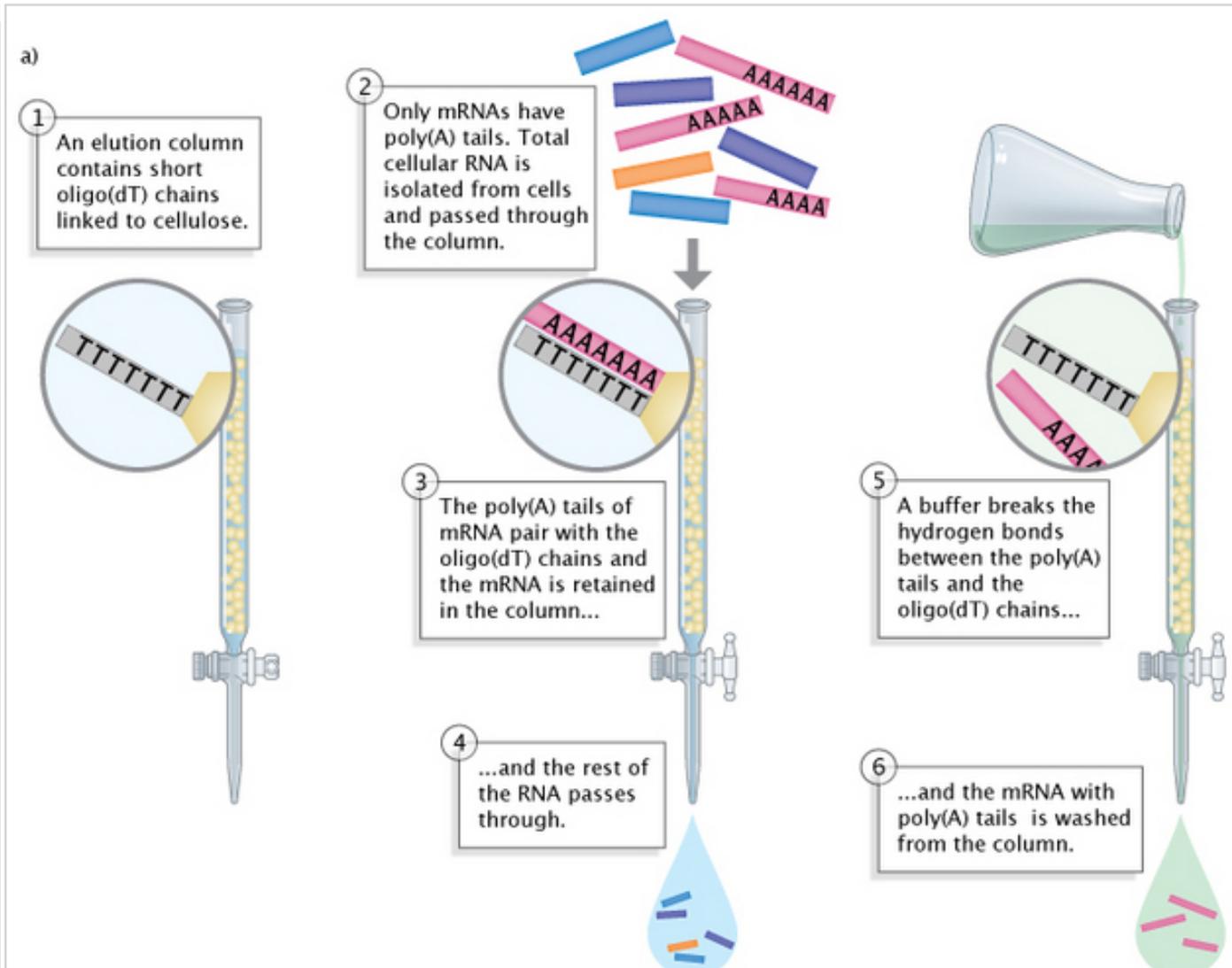
O Que é o Dogma Central Reverso?



Quais os dois passos para produção de cDNA a partir de RNA?

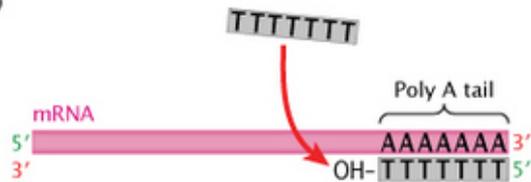
- Passo 1** – Isolamento do mRNA.
- Passo 2** – Enzima transcriptase reversa sintetiza DNA.

PASSO 1 - ISOLAMENTO DO MRNA UTILIZANDO UMA COLUNA DE ELUIÇÃO



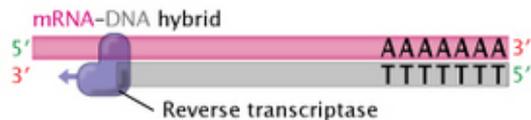
PASSO 2: SÍNTESE DE DNA PELA TRANSCRIPTASE REVERSA UTILIZANDO mRNA COMO MOLDE

b)



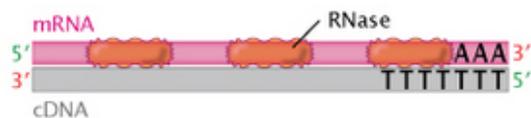
7

Oligo(dT) primers are added, which anneal to the poly(A) tails of the mRNA and provide 3'-OH groups for DNA synthesis.



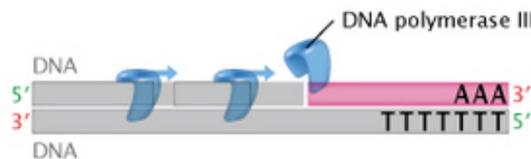
8

Reverse transcriptase synthesizes a DNA strand by using the mRNA as a template.



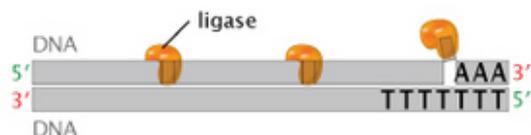
9

The RNA-DNA hybrid molecule is briefly treated with RNase, which partly digests the RNA strand.



10

DNA polymerase is used to synthesize the second DNA strand by using the short un-digested RNA pieces as primers.



11

The nicks in the sugar-phosphate backbone are sealed by DNA ligase.

Como os cientistas podem avaliar a expressão gênica?

- Northern blot
- Análise serial da expressão gênica (SAGE)
- Análise de microarray
- RNA seq

Qual a diferença entre eles?

Qual a diferença entre as várias técnicas de avaliar a expressão gênica?

Northern blot

- Permite identificar o nível de transcrição de um único gene (2 ou 3 genes no máximo).
- Depende de lavar a membrana de nitrocelulose e re-exposição ao protocolo de hibridação utilizando outra sonda de DNA (outro gene).
- Não é dependente da conversão do mRNA em molécula de cDNA.
- Não é dependente da reação da transcriptase reversa.

Qual a diferença entre as várias técnicas de avaliar a expressão gênica?

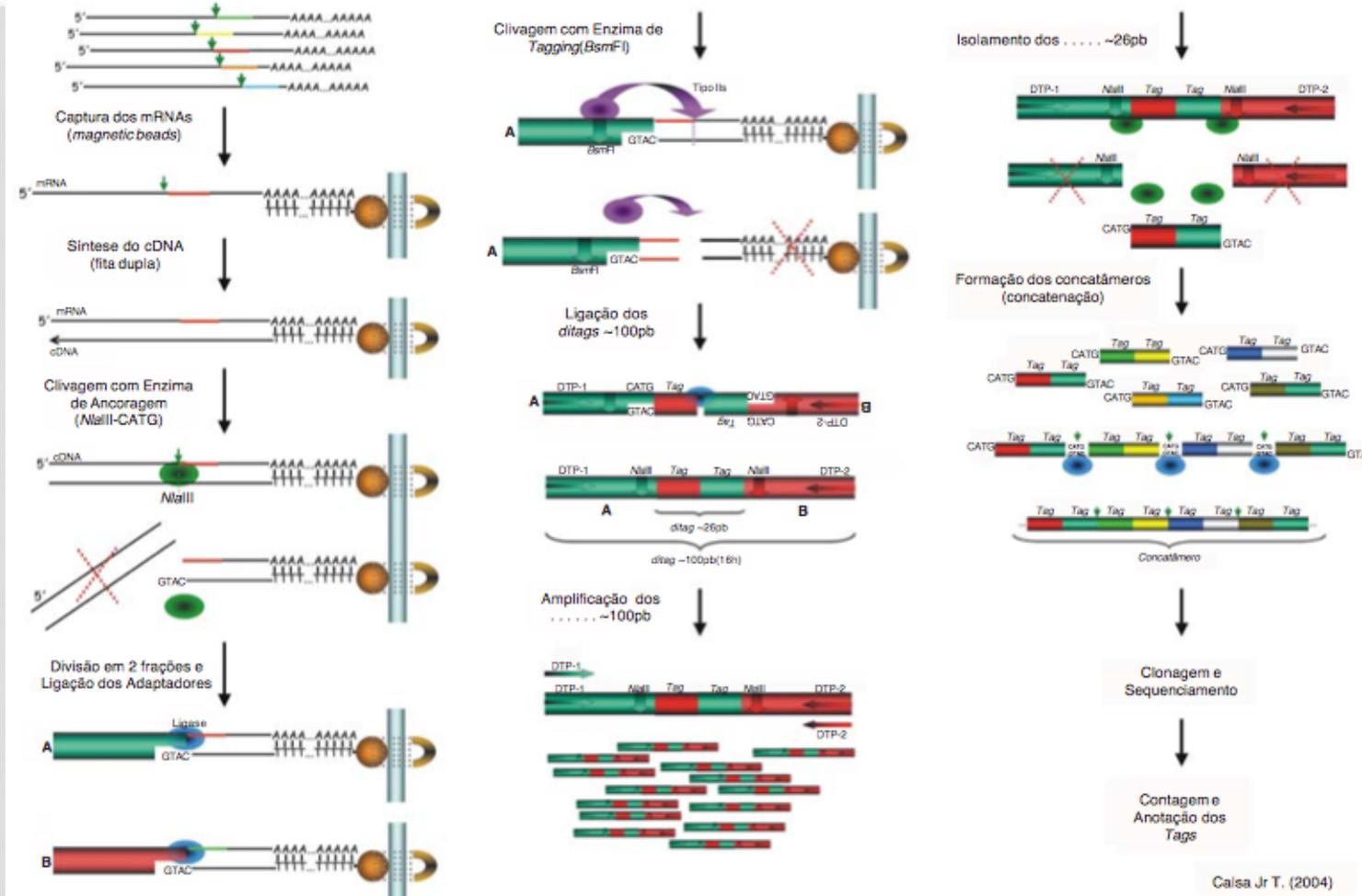
Análise serial da expressão gênica (SAGE)

- Permite o estudo da expressão gênica de múltiplos genes simultaneamente conhecido como?

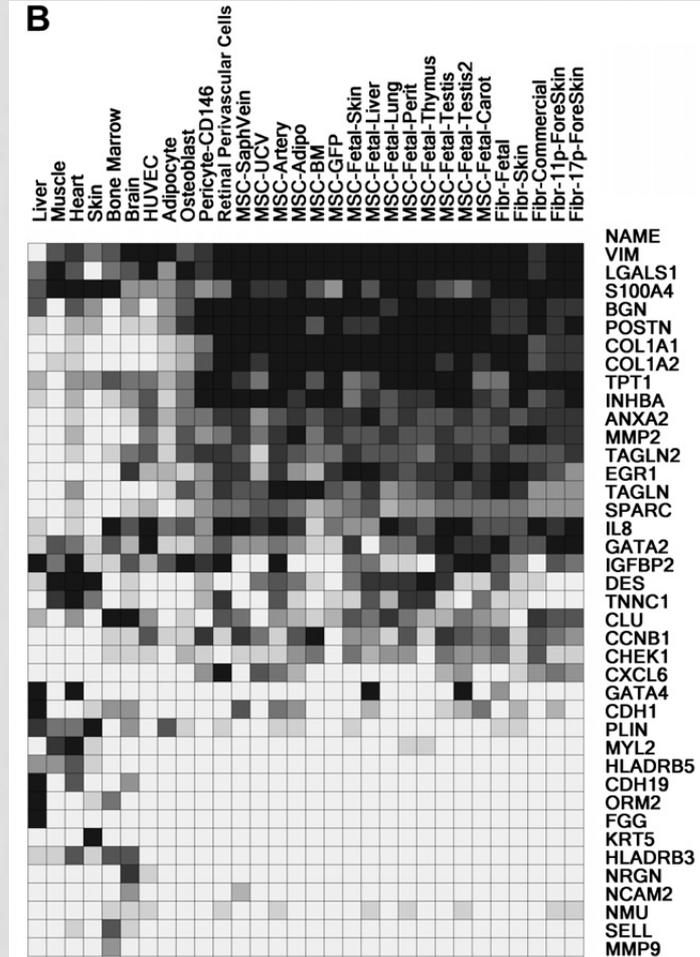
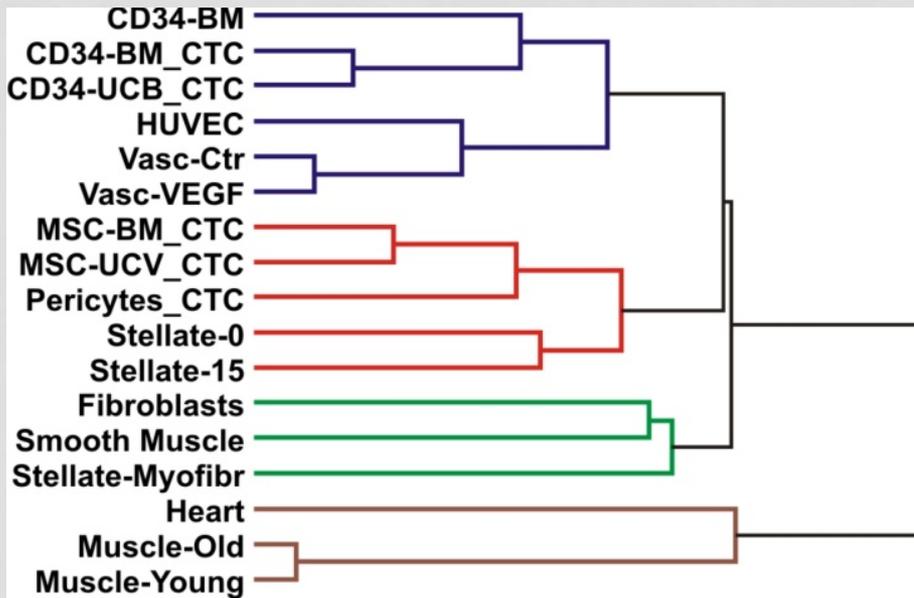
Transcriptoma

- É dependente da conversão do mRNA em molécula de cDNA.
- É dependente do uso de *tags* de cerca de 14 nucleotídeos de comprimento que são complementares ao mRNA da célula.
- É dependente da construção de uma biblioteca de cDNA.
- É dependente do sequenciamento dos clones obtidos.

Análise serial da expressão gênica



Análise serial da expressão gênica

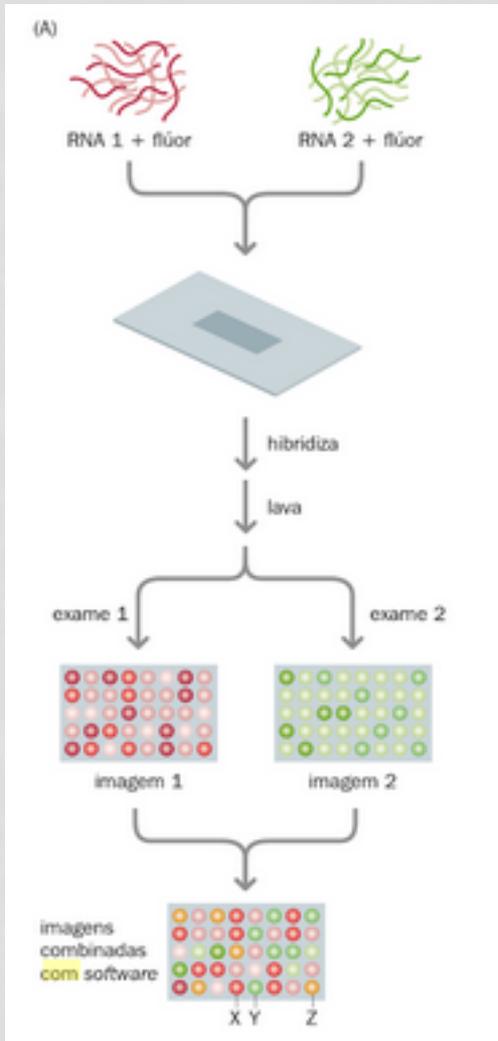


Qual a diferença entre as várias técnicas de avaliar a expressão gênica?

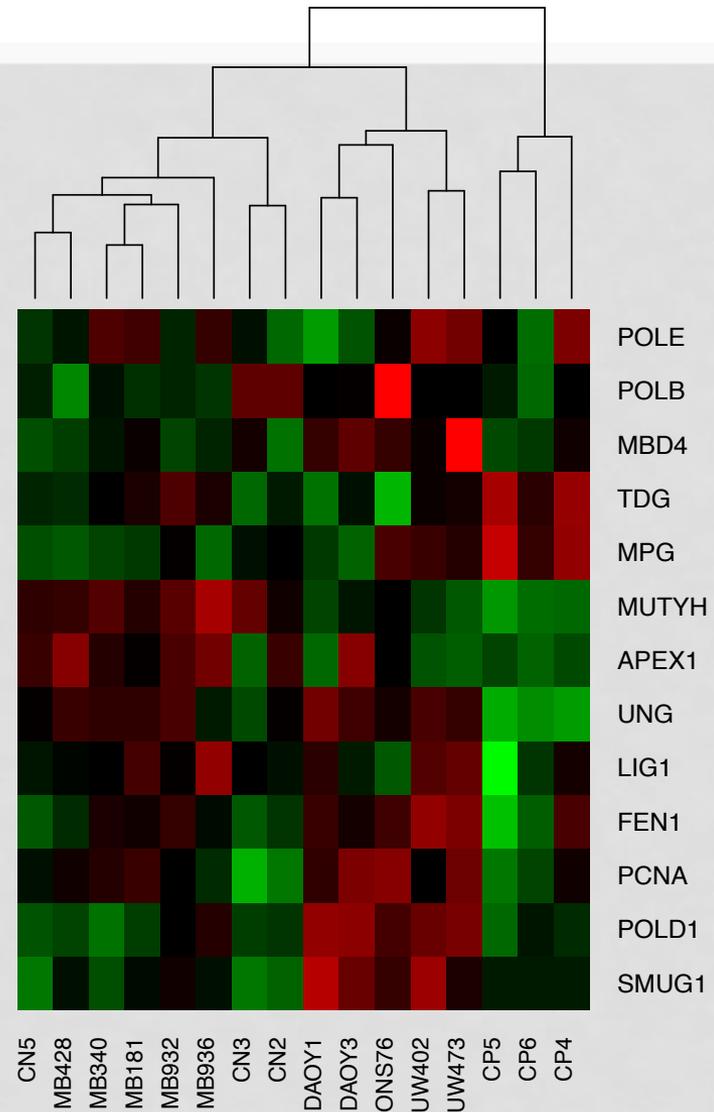
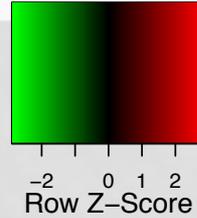
Análise de microarray

- Conhecido como análise genômica da expressão gênica.
- É dependente da conversão do mRNA em molécula de cDNA.
- Não é necessário a construção de uma biblioteca de cDNA.
- O cDNA gerada é hibridizado contra um microarranjo que contém milhares de sondas de DNA não marcadas ou de sondas de oligonucleotídeos fixadas a uma superfície de material adequado.
- O nível de transcrição de cada gene é avaliado pela intensidade do sinal de hibridação.

Análise de Microarray



Color Key



Quais informações podem ser obtidas a partir da análise de

- Identificação de genes e vias moleculares envolvidas em processos biológicos.
- Exemplo, em determinado subtipo tumoral pode ocorrer a expressão de genes específicos .
 - Desenvolvimento de drogas.
- Identificar marcadores para diagnóstico molecular das doenças.
- Identificar alterações no proteoma e/ou metaboloma.
- Traçar o perfil de expressão gênica em determinada doença genética ou determinado período do desenvolvimento.
- Prognóstico.

Qual a diferença entre as várias técnicas de avaliar a expressão gênica?

RNA seq



Próxima aula e nos projetos

Pergunta associada aos projetos que serão desenvolvidos

- Genética de populações envolve o estudo de populações a nível genético.
- O conjunto de todos os alelos de uma população é conhecido como *pool* gênico.
- Mudanças no *pool* gênico levam a adaptação da espécie e por fim a evolução.



O Projeto do Microbioma Hospitalar que envolverá a análise de RNA seq é um projeto de genética de populações?