

# TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE: HISTÓRICO, ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E VETORES

## Aula 3

LGN0232 – Genética molecular



Maria Carolina Quecine  
Departamento de Genética  
mquecine@usp.br

# *Homo sapiens*: UMA ESPÉCIE TECNOLÓGICA

- Antes de compreender já explorava os recursos naturais.
- Exploração da biotecnologia: cultivar plantas, criar animais, fermentação.
- Entender os seres vivos ou parte deles: produtos e serviços.



# SERES VIVOS: HEREDITARIEDADE E VARIAÇÃO















- Mecanismos desconhecidos.
- Cruzamentos experimentais → híbridos instáveis.
- Resultados imprevisíveis e instáveis.



# MENDEL E AS LEIS DA HERANÇA



- Resultados previsíveis e estáveis.
- Manipulação de cruzamentos e melhoramento genético.
- Novos estudos e novas aplicações.

Seed shape	Seed color	Flower color	Flower position
 round	 yellow	 purple	 axial (side)
 wrinkled	 green	 white	 terminal (tips)
Pod color	Pod shape	Plant height	
 green	 inflated	 tall	
 yellow	 constricted	 short	

# MAIS CONHECIMENTO E MAIS BIOTECNOLOGIA

Novos conhecimentos resultam em novas aplicações: teoria cromossômica da herança; estrutura e funções do material genético; tecnologia do DNA recombinante e engenharia genética.

**Engenharia Genética ou **Tecnologia do DNA Recombinante** é um conjunto de técnicas que permite aos cientistas identificar, isolar e multiplicar genes de quaisquer organismos.**



## CONCEITO IMPORTANTE!!

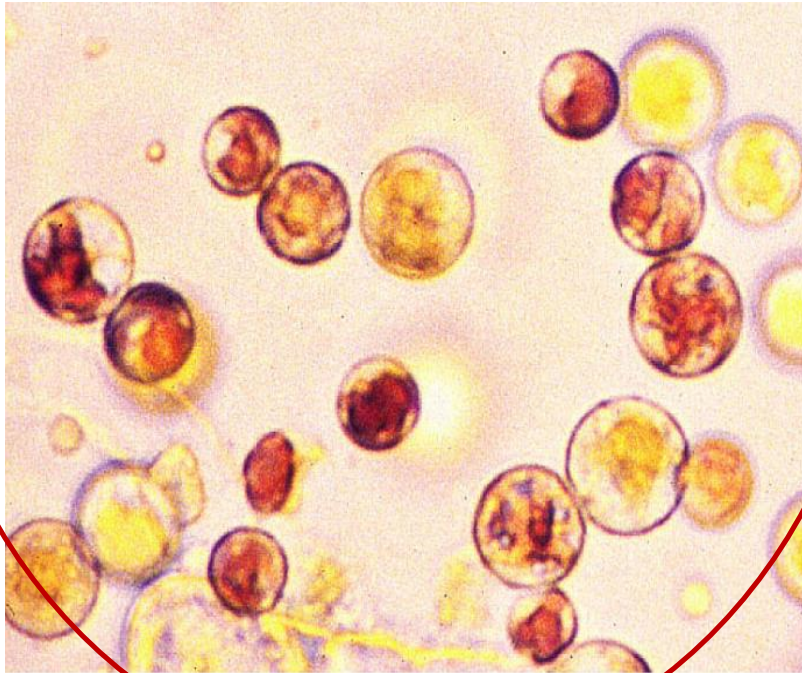
**Diplóides somente duas cópias do DNA de interesse...Primeiro passo para a TDR é a clonagem!**

*Clonagem: obtenção de uma grande quantidade de uma determinada sequencia de DNA de interesse*



# PRECISA ISOLAR, CLONAR O DNA, MAS COMO?

Clonagem dependente  
de células



Clonagem independente de  
células (PCR)



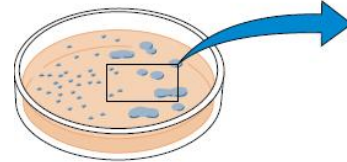
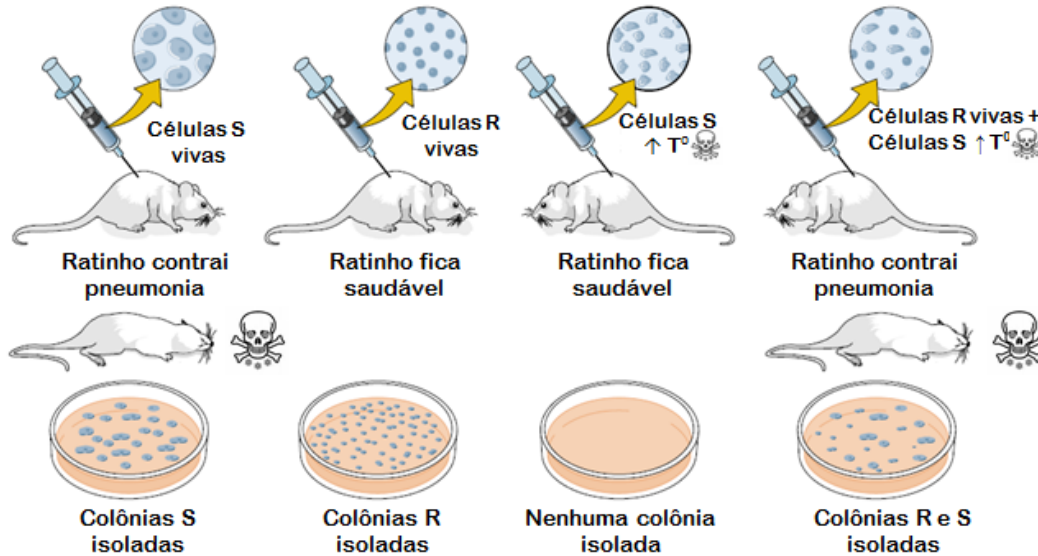
# HISTÓRICO DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE (TDR)

**1944** - Oswald Avery descobre que o DNA é o componente que transmite as informações genéticas e que este é o principal constituinte dos genes.





## 1928 - Frederick Griffith



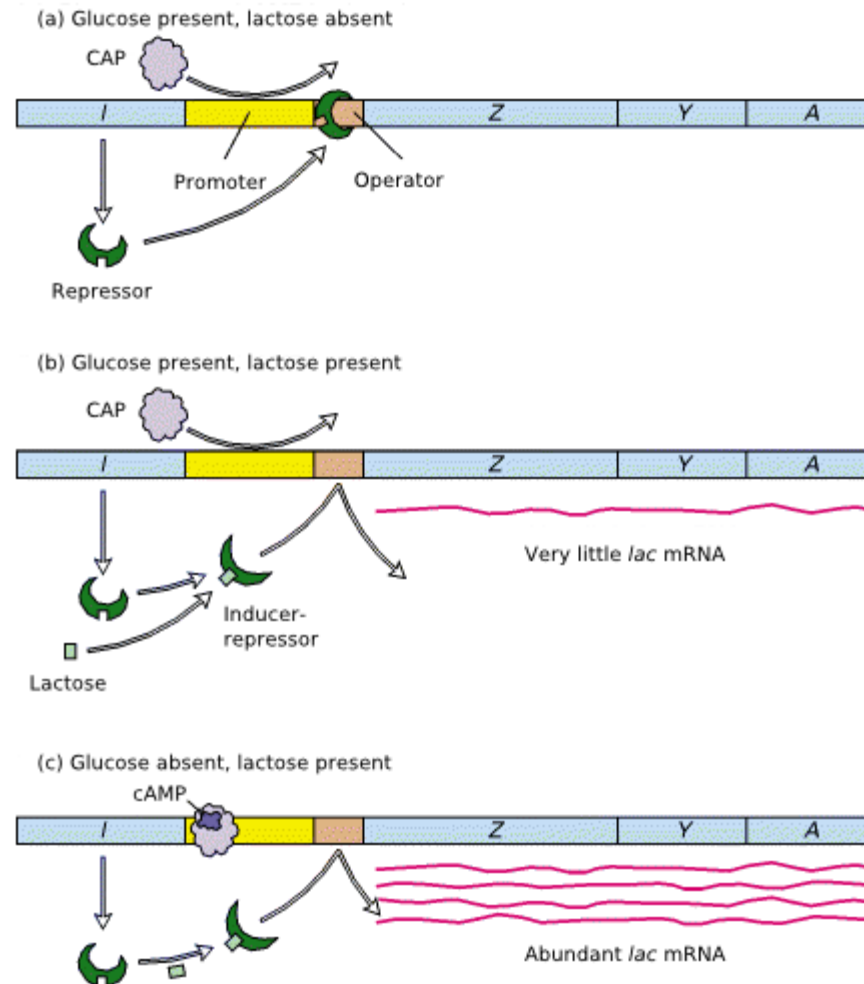
**Material genético das bactérias virulentas (mortas) foi responsável pela transformação das bactérias não virulentas (vivas)**

## Daí entra Oswald Avery ...

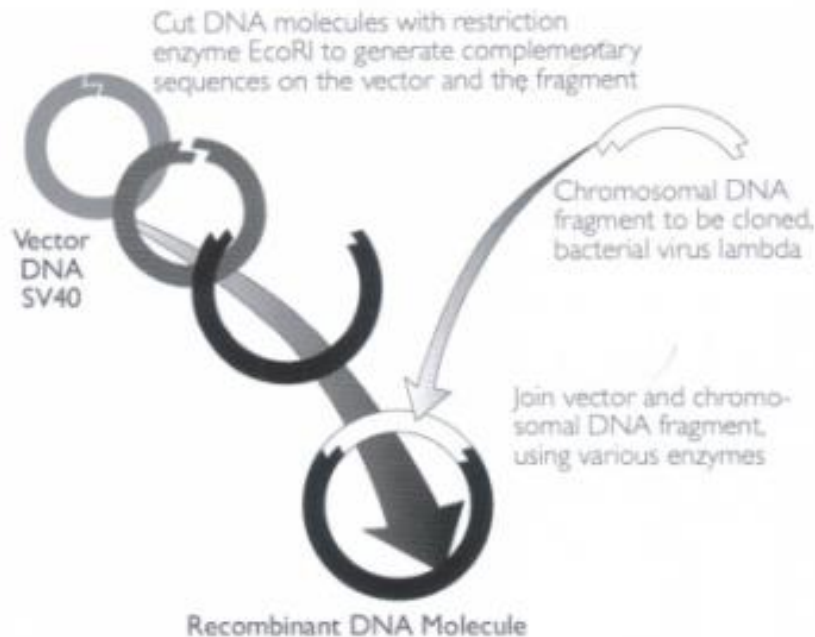
- A atividade de transformação das células S **não é destruída pelo calor.**
- A atividade de transformação das células S **não é destruída por proteases ou RNases.**
- A atividade de transformação das células S **é destruída por DNases.**

**PRINCÍPIO TRANSFORMANTE**

**1961** - François Jacob e Jacques Monod estudaram o processo de síntese de proteínas nas células de bactérias e descobriram que o principal responsável por essa síntese é o DNA.



**1972** - Paul Berg realizou a primeira experiência bem sucedida onde foram ligadas duas cadeias genéticas diferentes: ele ligou uma cadeia de DNA do fago  $\lambda$  junto ao operon da galactose de *Escherichia coli*, inserindo-os no DNA do vírus SV40.



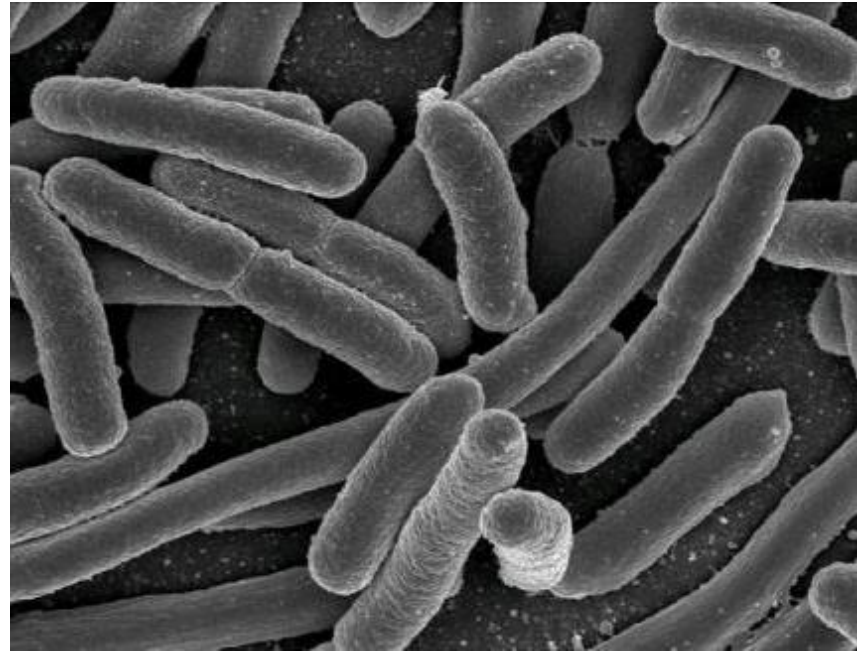
Jackson, D.A., Symons, R.H. & Berg, P. Biochemical method for inserting genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA **69**, 2904-2909 (October 1972).

# COHEN E BOYER (1973)

- Organismos vivos podem ser portadores de genes de outros organismos.
- Enzimas que clivam e reconstituem fragmentos de DNA que contêm tais genes.
- Moléculas de DNA de um organismo isoladas e manipuladas para inserção no DNA de outro organismo.

# O GRANDE MARCO...

Cohen e Boyer (1973)



## Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

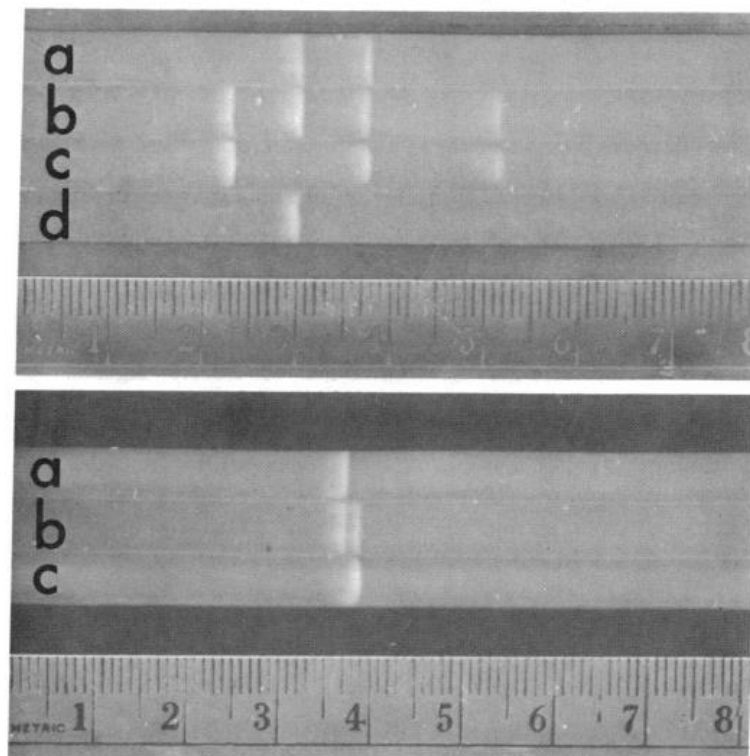
(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

STANLEY N. COHEN\*, ANNIE C. Y. CHANG\*, HERBERT W. BOYER†, AND ROBERT B. HELLING†

\* Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and † Department of Microbiology, University of California at San Francisco, San Francisco, Calif. 94122

Communicated by Norman Davidson, July 18, 1973

**ABSTRACT** The construction of new plasmid DNA species by *in vitro* joining of restriction endonuclease-generated fragments of separate plasmids is described. Newly constructed plasmids that are inserted into *Escherichia coli* by transformation are shown to be biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences from both of the parent DNA molecules. Functional plasmids can be obtained by reassociation of endonuclease-generated frag-



# TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE (TDR)

- Avanço no desenvolvimento do conjunto de técnicas utilizados na TDR (1970s)
  - manipulação do DNA → combinações entre material genético de organismos diferentes.



# COMO FAZER UM DNA RECOMBINANTE?

Organismo de interesse



Extração do DNA total



Clivagem do DNA genômico ou PCR



Clonagem dos fragmentos em vetores



Armazenamento dos vetores em hospedeiros

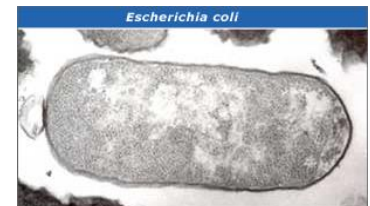
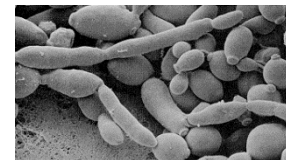
# FERRAMENTAS UTILIZADAS NA TDR

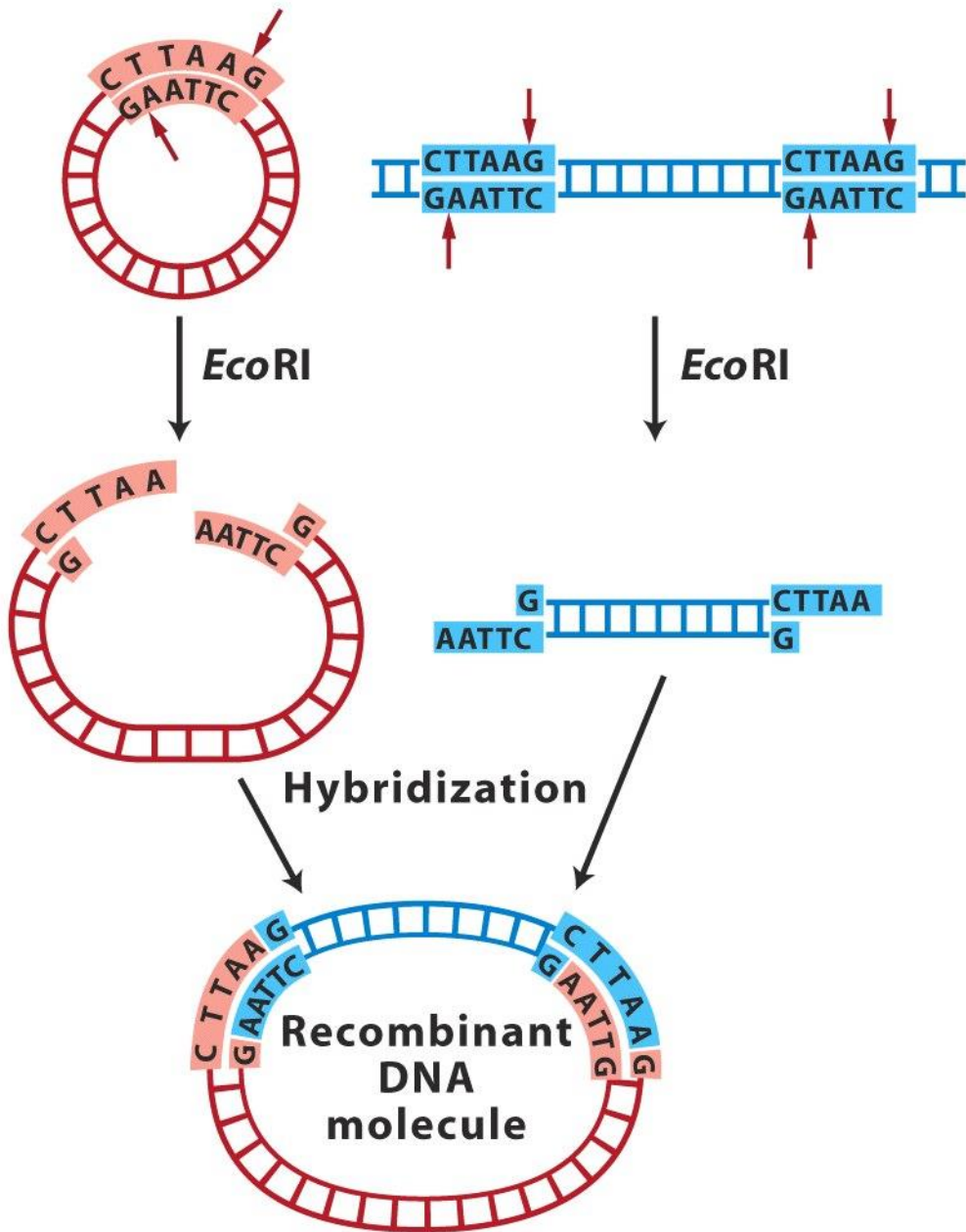
**Enzimas:** enzimas de restrição  
DNA ligase

**Vetores:** plasmídios  
fagos (vírus de bactérias)  
cosmídeos  
cromossomos artificiais



**Hospedeiros:** *E. coli*  
levedura  
células animais  
células vegetais



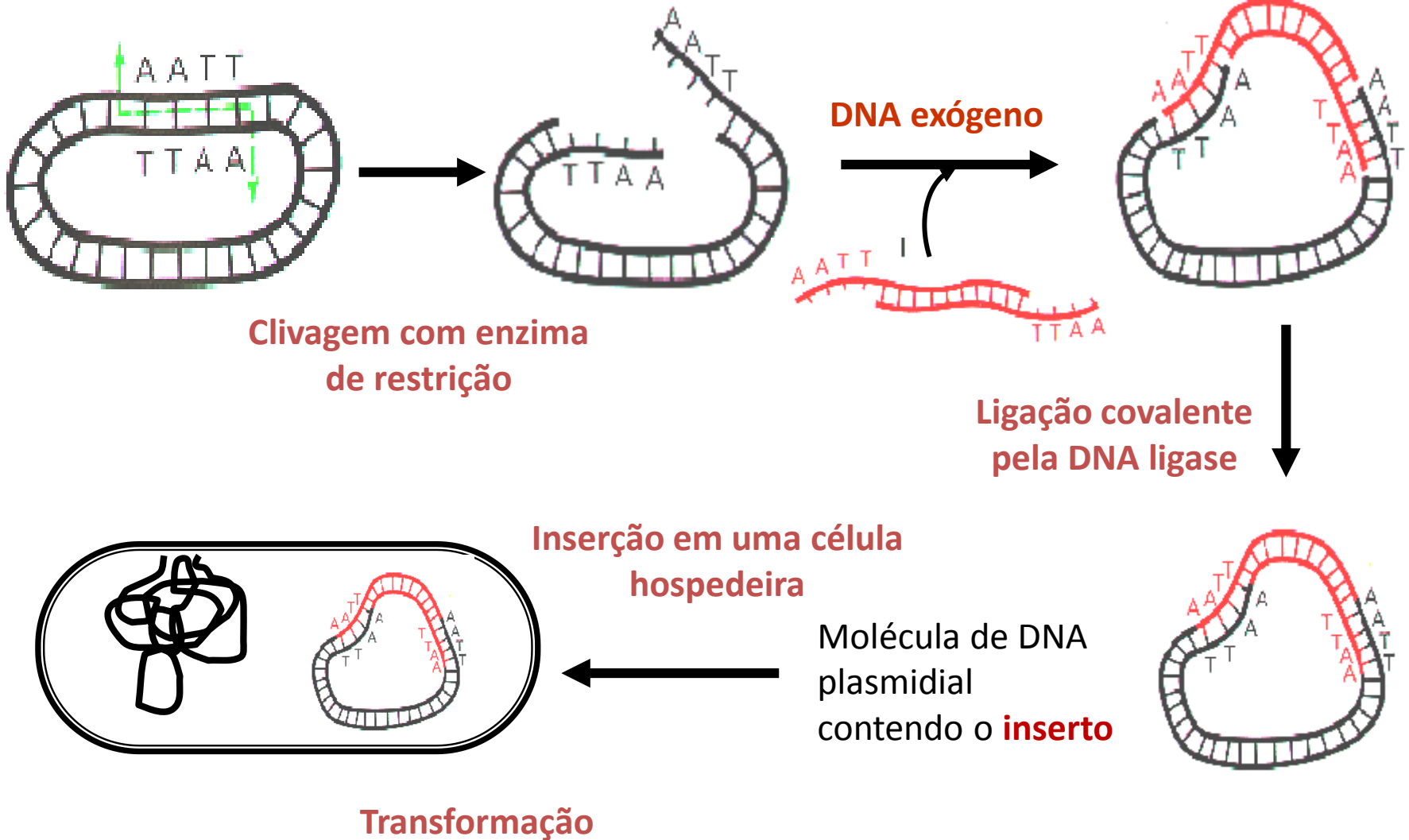


Formação de uma  
molécula de DNA  
recombinante

# CONSTRUÇÃO DO DNA RECOMBINANTE

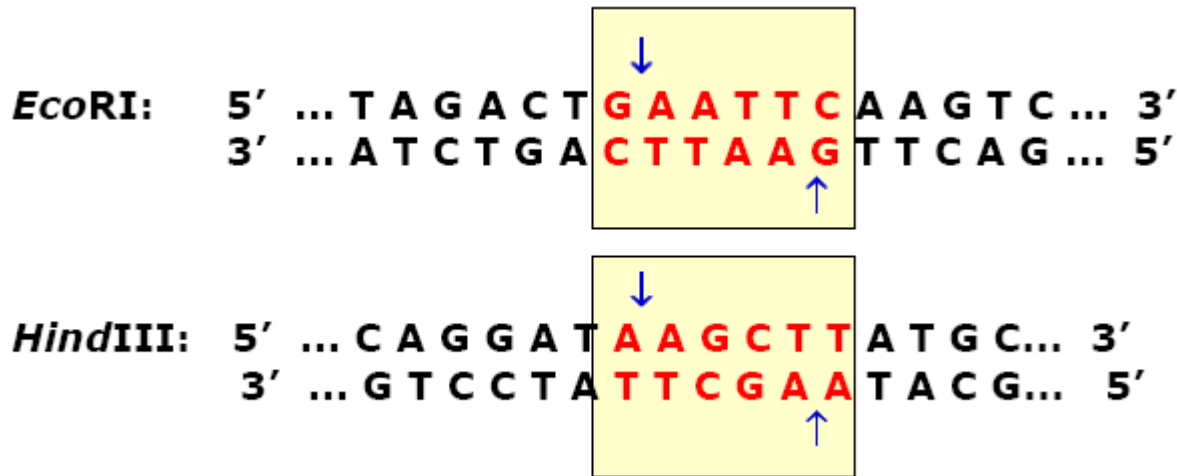
Molécula de DNA de um plasmídeo **circular**

Molécula de DNA de um plasmídeo **linear** com extremidades coesivas



# ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

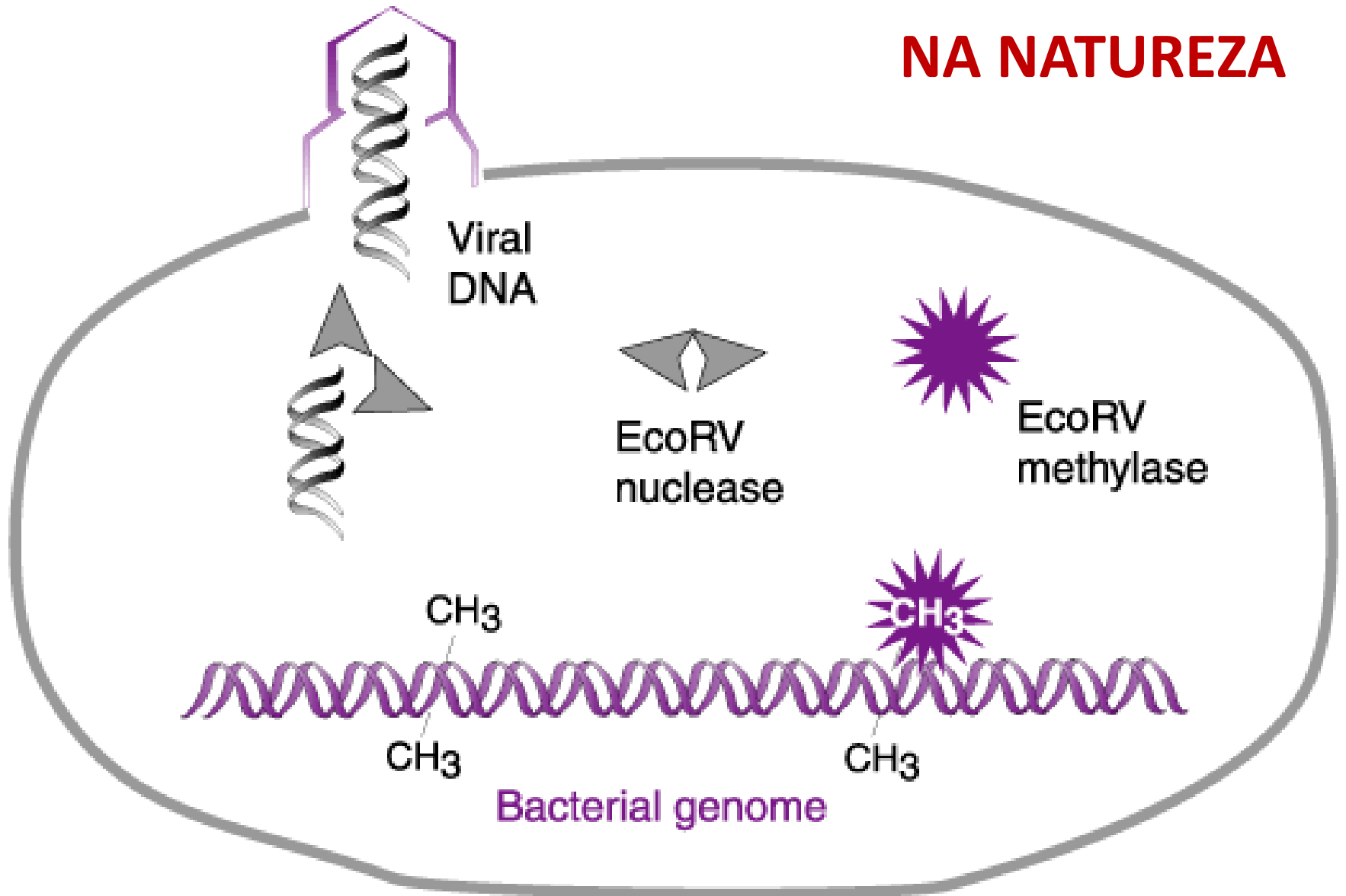
Proteínas que reconhecem e clivam o DNA em pontos específicos, geralmente em sequências de 4, 6 e 8 bases - **palíndromas**



# CARACTERÍSTICAS

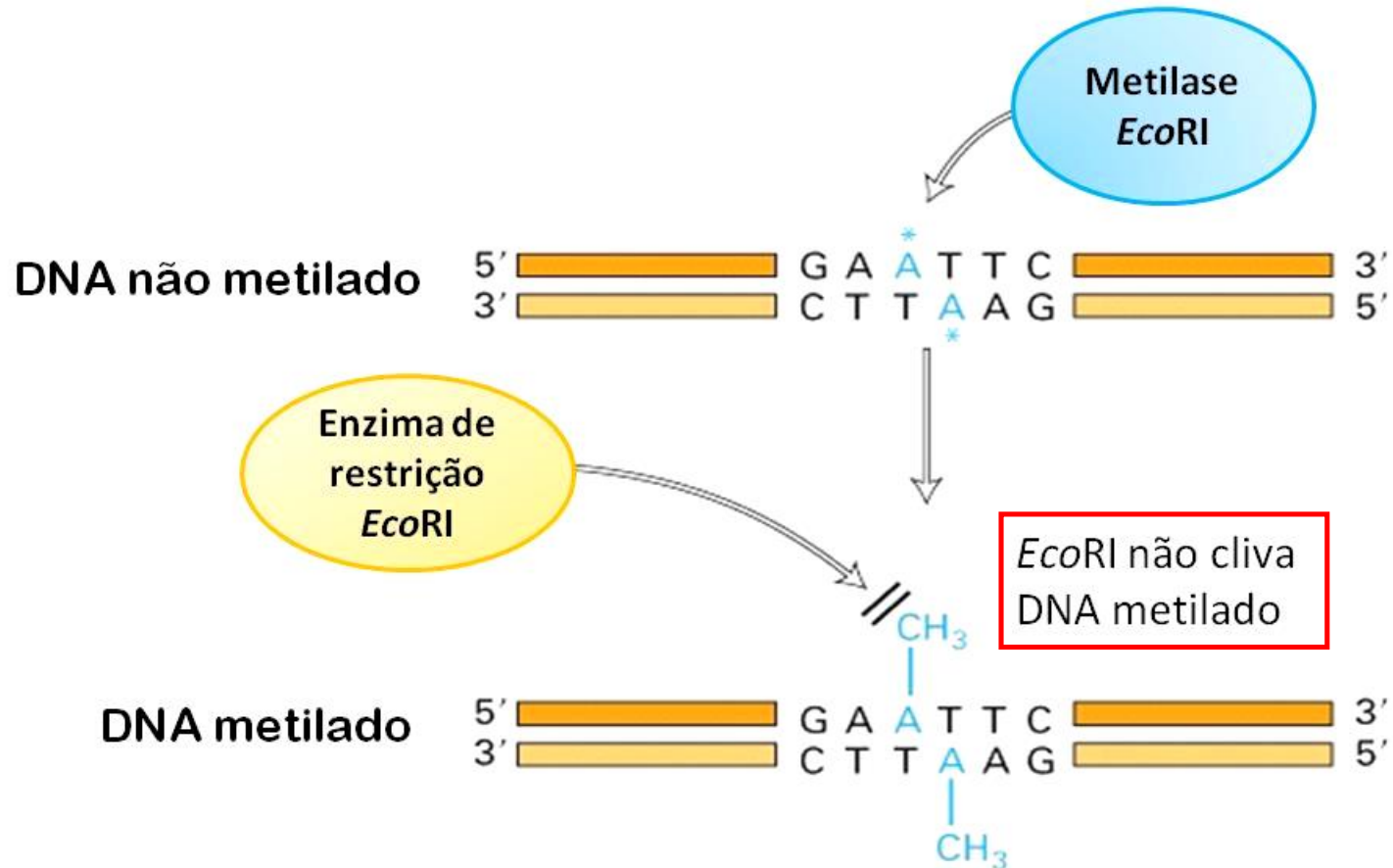
- **Enzimas de restrição são endonucleases;**
- Enzimas de bactérias;
- Diferentes linhagens de bactérias expressam enzimas de restrição;
- O nome da enzima é derivado do nome da linhagem e espécie bacteriana em que foi isolada;
- Cortam (hidrolisam) DNA em fragmentos definidos e reproduzíveis;
- Ferramenta básica em clonagem de genes.

# NA NATUREZA

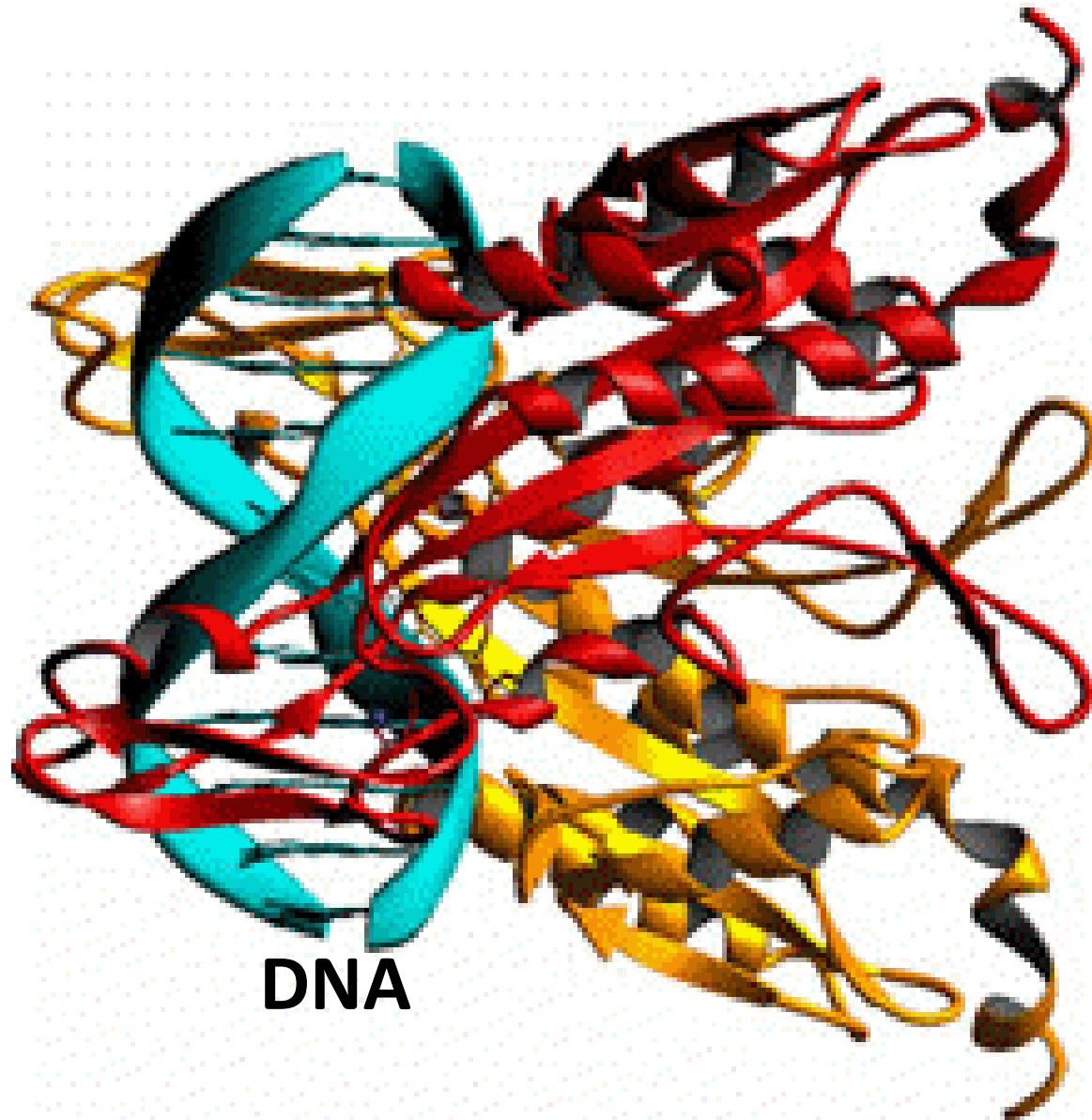




# ENZIMAS DE RESTRIÇÃO: POSSUEM SISTEMAS DE RESTRIÇÃO/MODIFICAÇÃO

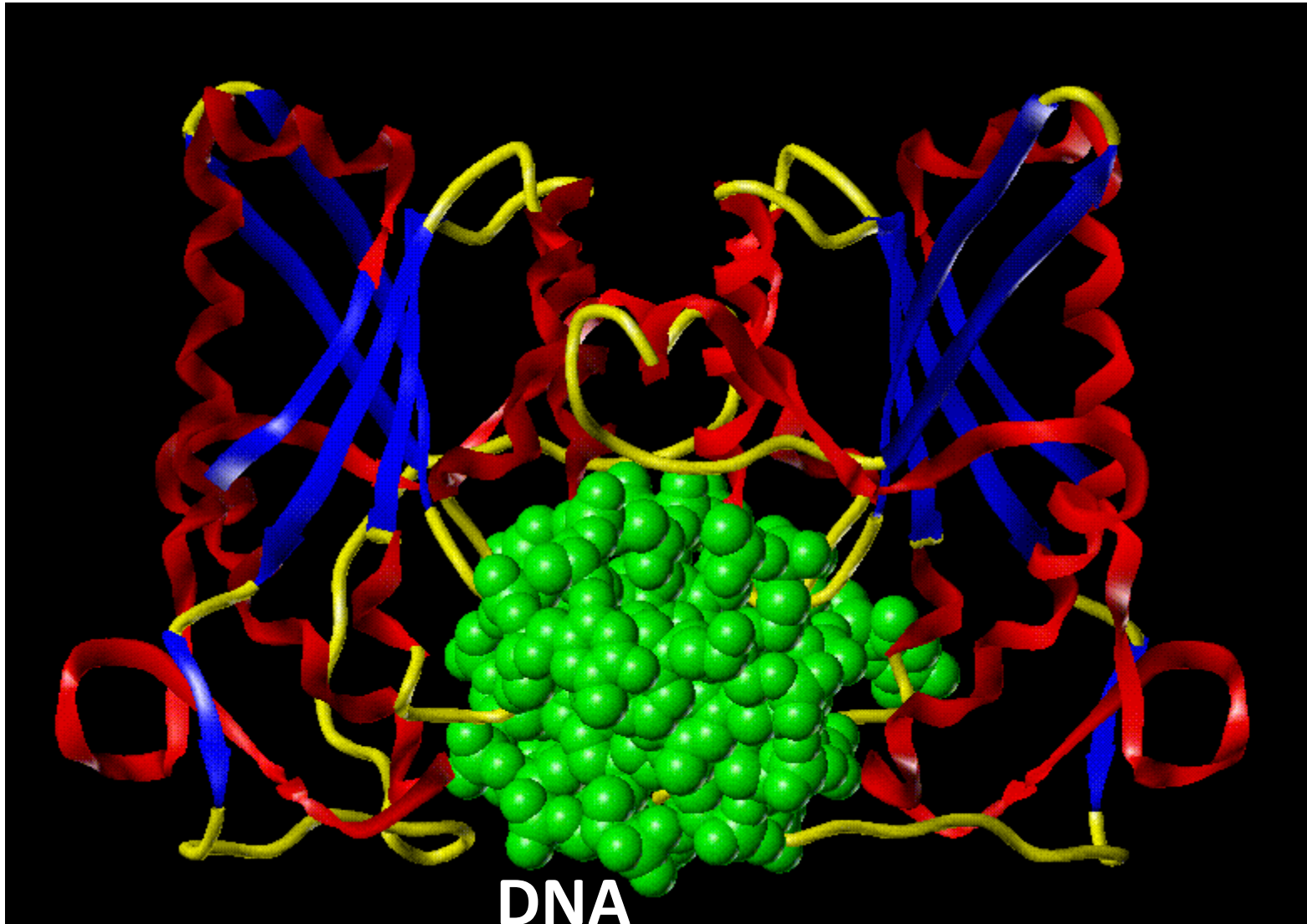


# ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *EcoRI*

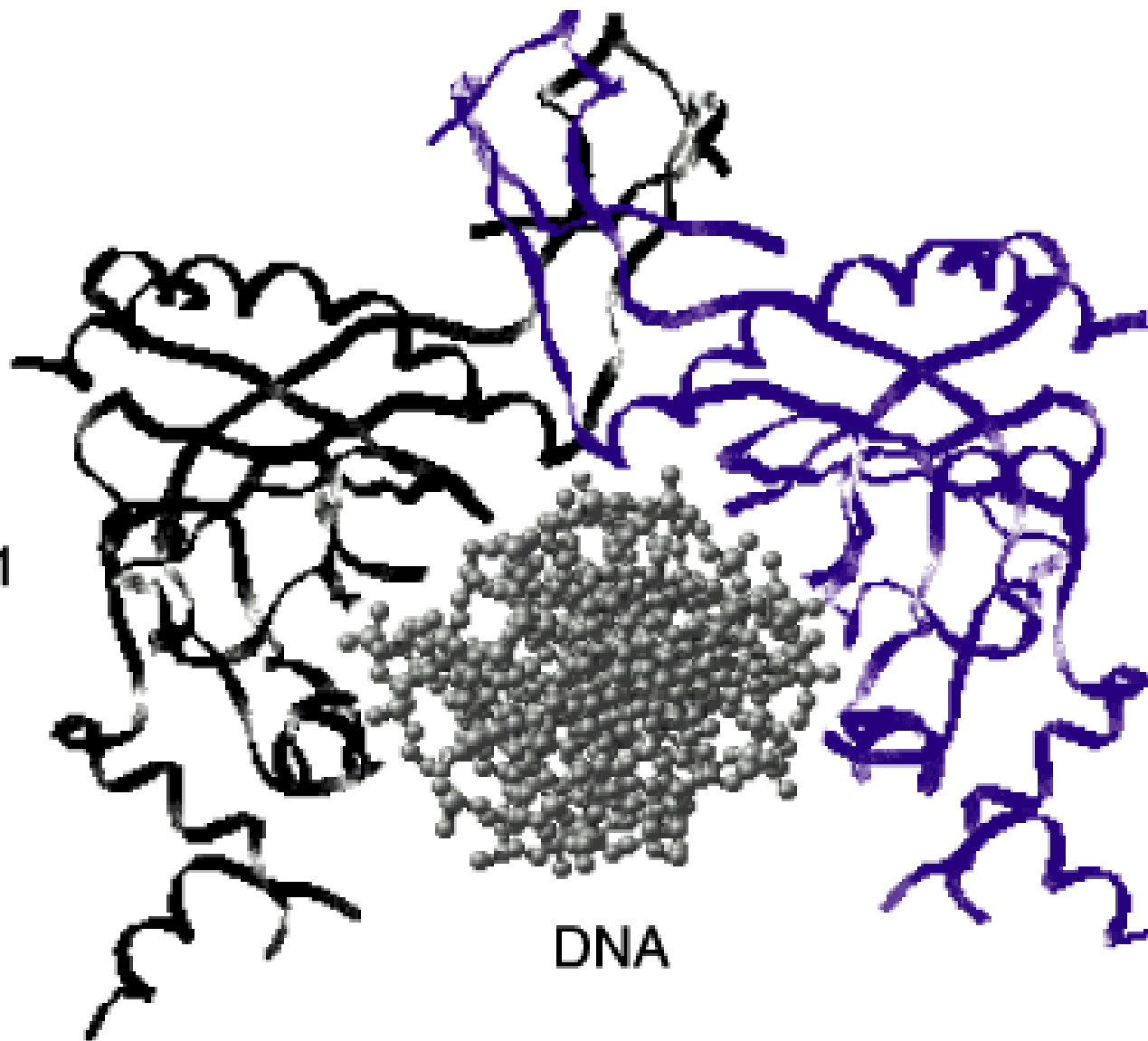


**DNA**

# ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *Bam*HI



EcoRV  
subunit 1

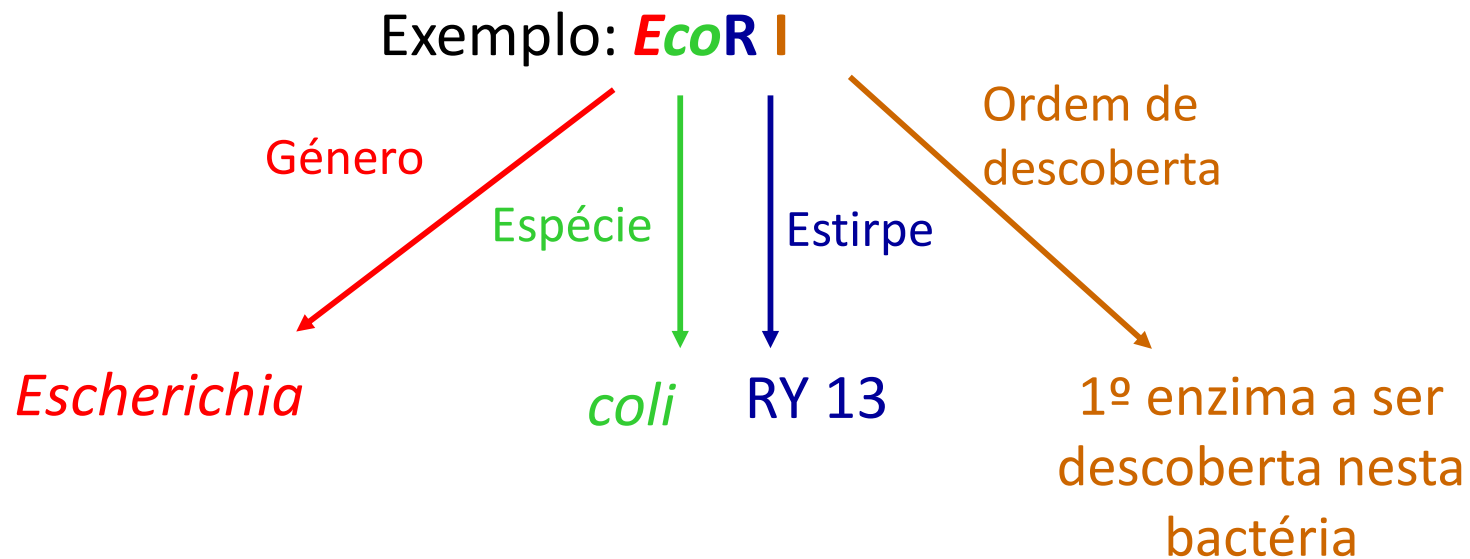


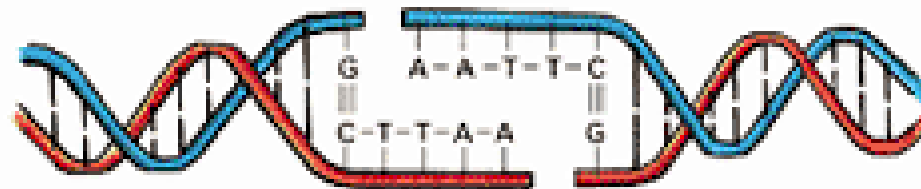
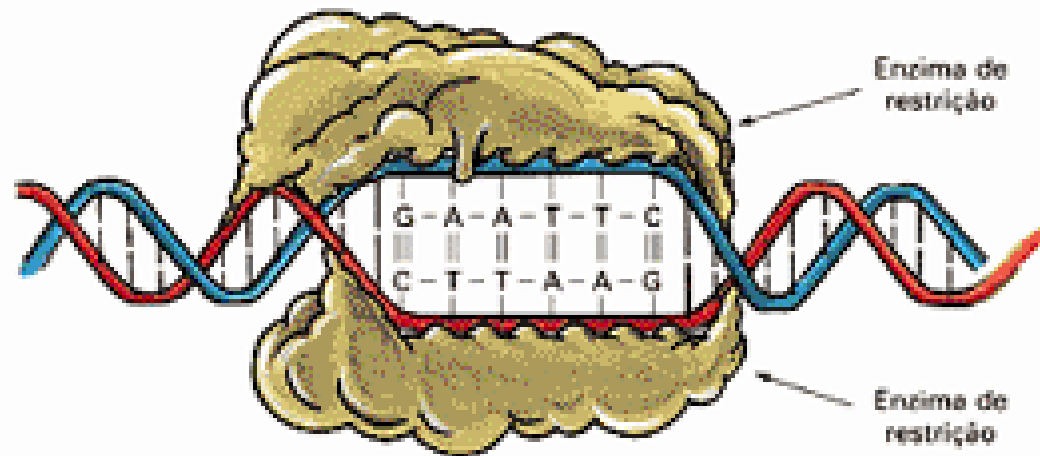
EcoRV  
subunit 2

DNA

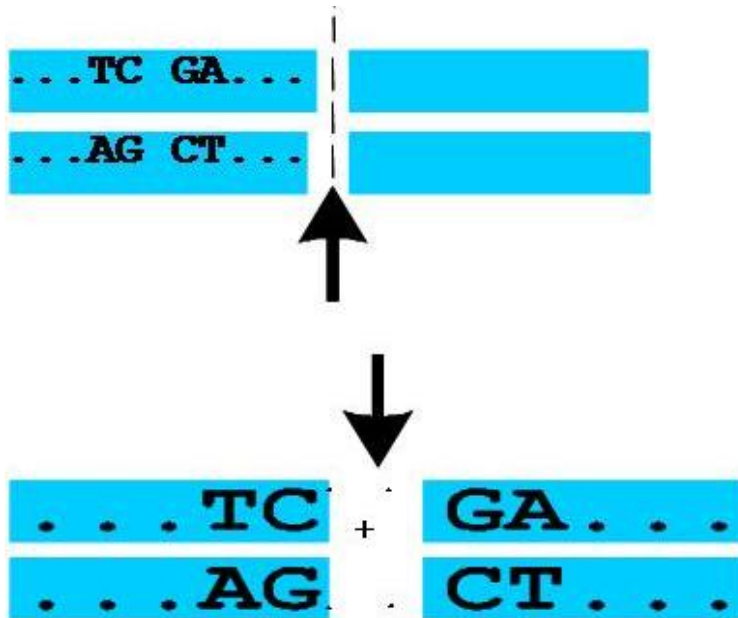
# NOMENCLATURA

As enzimas de restrição são chamadas de acordo com a bactéria que a produziu

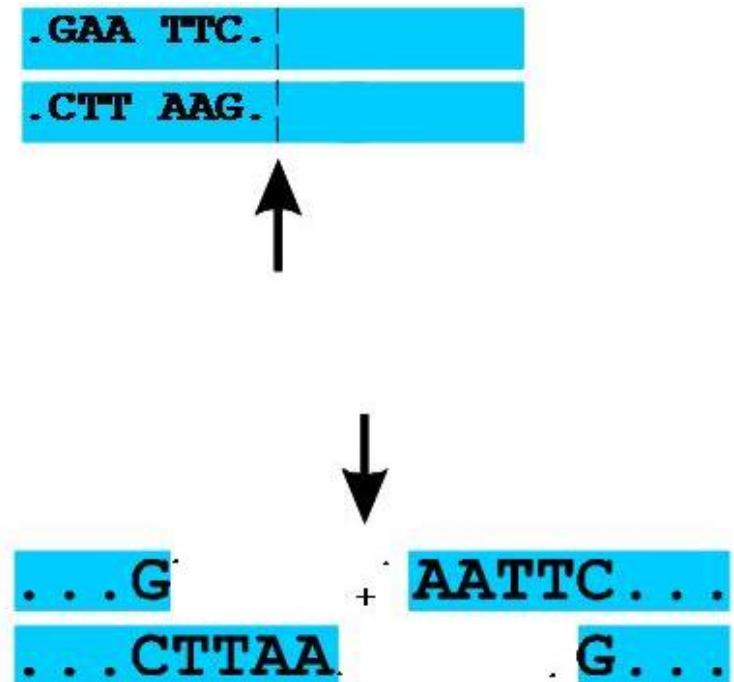




# DOIS TIPOS DE CORTES...



Moléculas com extremidades cegas



Moléculas com extremidades coesivas

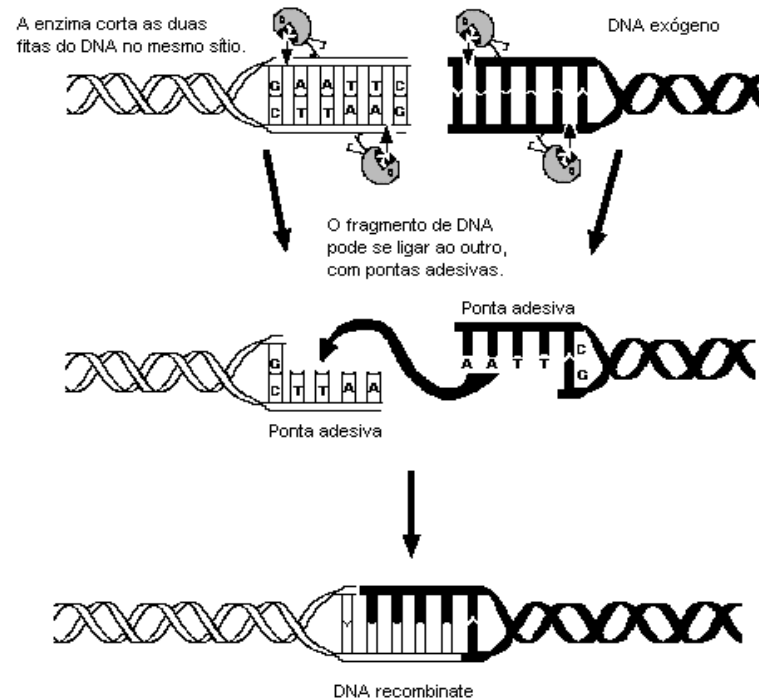


# EXISTEM VÁRIAS ENZIMAS...

Microrganismo	Enzima	Sequência Alvo
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	<pre>       ↓     G A   A T T C     C T   T A A G       ↑           </pre>
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	<i>BamHI</i>	<pre>       ↓     G G   A T C C     C C   T A G G       ↑           </pre>
<i>Bacillus globigii</i>	<i>BglII</i>	<pre>       ↓     A G   A T C T     T C   T A G A       ↑           </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeII</i>	<pre> Pu  G   C G C Pi Pz  C   G C G B       ↑           </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HindIII</i>	<pre>       ↓     A A   G C T T     T T   C G A A       ↑           </pre>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>PstI</i>	<pre>       ↓     C T   G C A G     G A   C G T C       ↑           </pre>
<i>Streptococcus albus G</i>	<i>SaII</i>	<pre>       ↓     G T   C G A C     C A   G C T G       ↑           </pre>
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	<pre>       ↓     T C   G A     A G   C T       ↑           </pre>
<i>Brevibacterium albidium</i>	<i>BaII</i>	<pre>       ↓     T G   G C C A     A C   C G G T       ↑           </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	<pre>       ↓     A G   G C T     T C   C G A       ↑           </pre>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	<pre>       ↓     C C   C G G G     G G   G C C C       ↑           </pre>

# E ASSIM RECOMBINO DNA...

## Enzima de Restrição Ação da EcoR1



**Mas como ele é mantido e multiplicado???**

# VETORES DE CLONAGEM

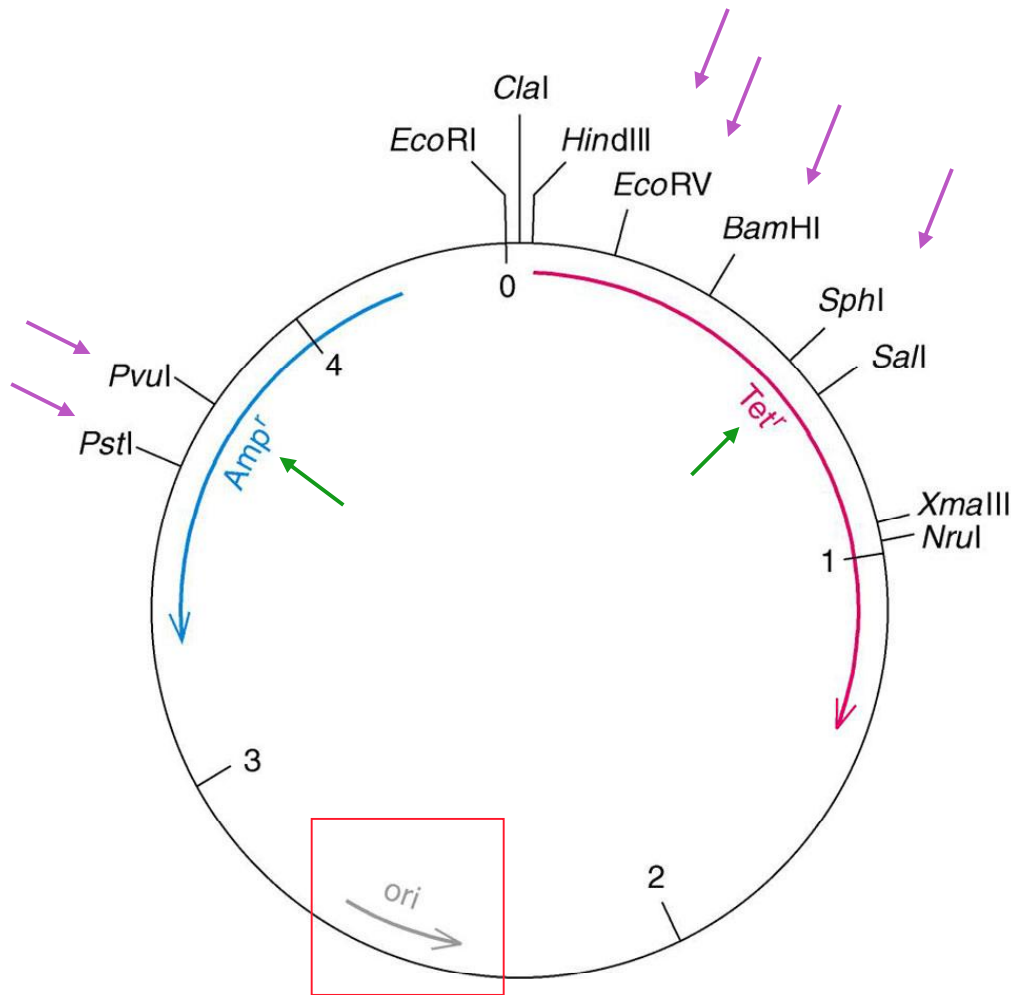
Um vetor de clonagem é uma molécula de DNA que leva até à célula hospedeira o DNA alvo, e que aí se replica.

Quatro tipos de vetores para clonagem podem ser usados, dependendo do tamanho do inserto:

- **Plasmídeo - 0,1 a 10 Kb**
  - **Ex: pBR322; pUC; pGEM; pBluescript; pET**
- Fago lambda - ~0,1 a 20 Kb
- Cosmídeo - ~35 a 50 kb
- Cromossomos artificiais de bactérias e leveduras - fragmentos maiores (BAC - ~100 kpb e YAC – 2 Mpb)



# VETORES: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS



## ■ Origem de replicação

↓  
Permite a auto-replicação, independente do cromossomo

## ■ Genes para resistência a antibióticos

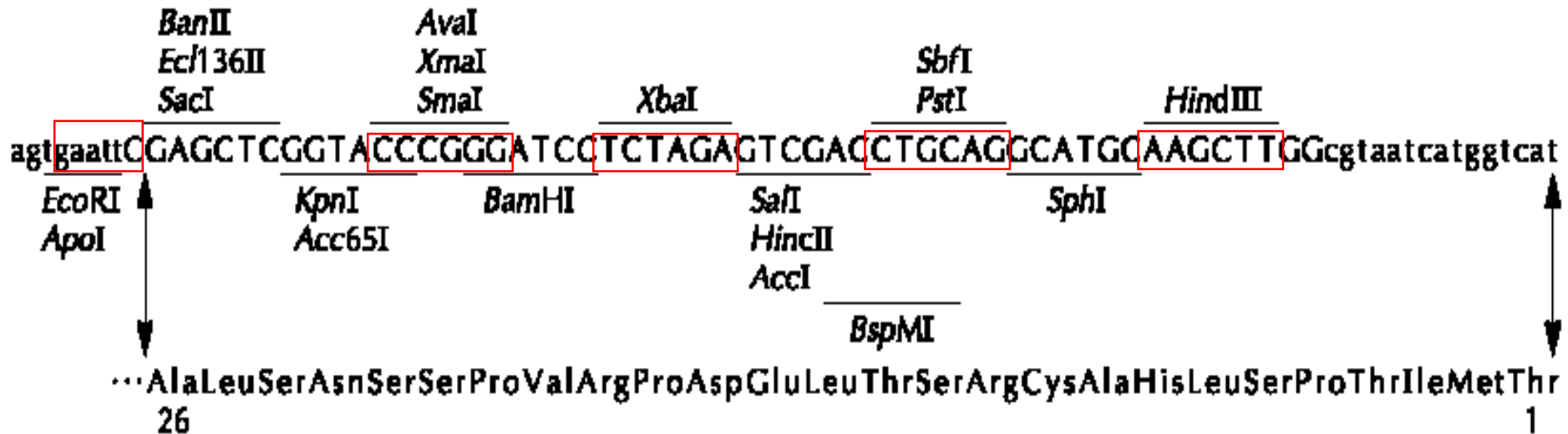
↓  
Permite que a célula hospedeira cresça em meio seletivo

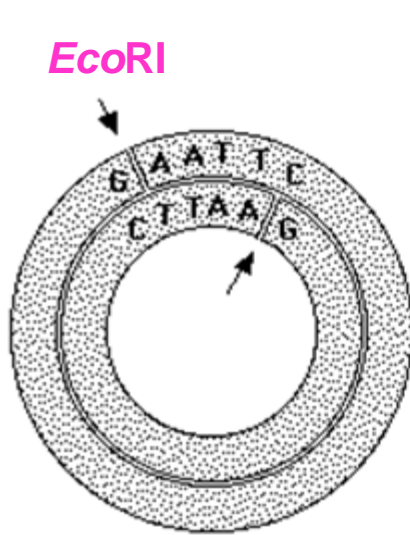
## ■ Múltiplos sítios de clonagem

↓  
Permite a inserção de DNA exógeno

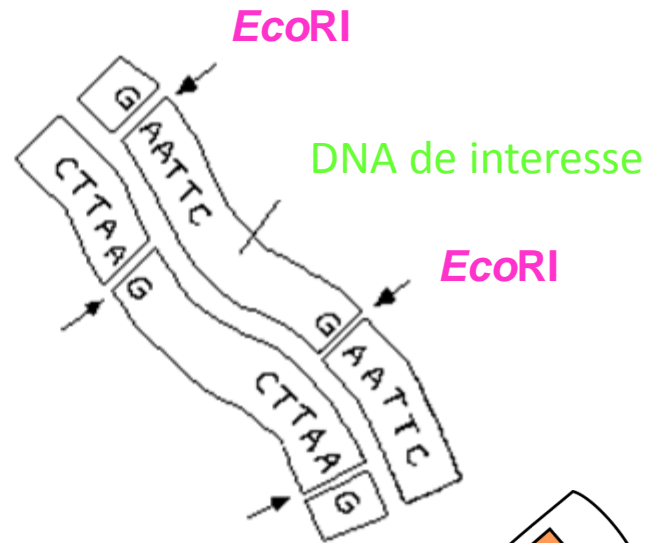
# VETORES DE CLONAGEM

*Poli-linker* (sítio múltiplo de clonagem)



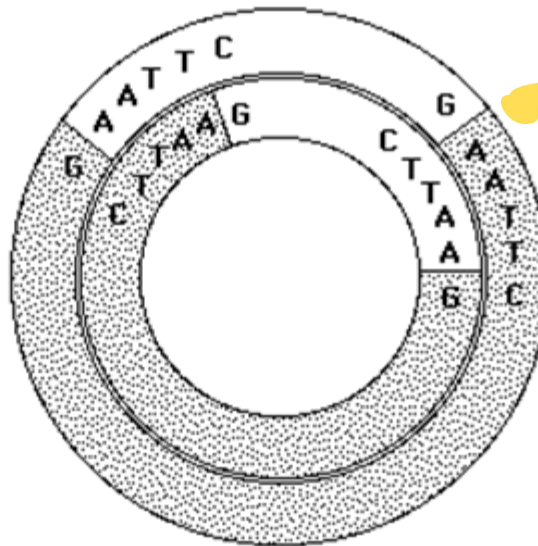


Plasmídeo

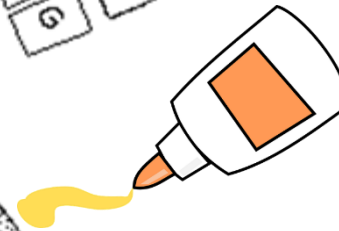


Extremidades coesivas

Ligação

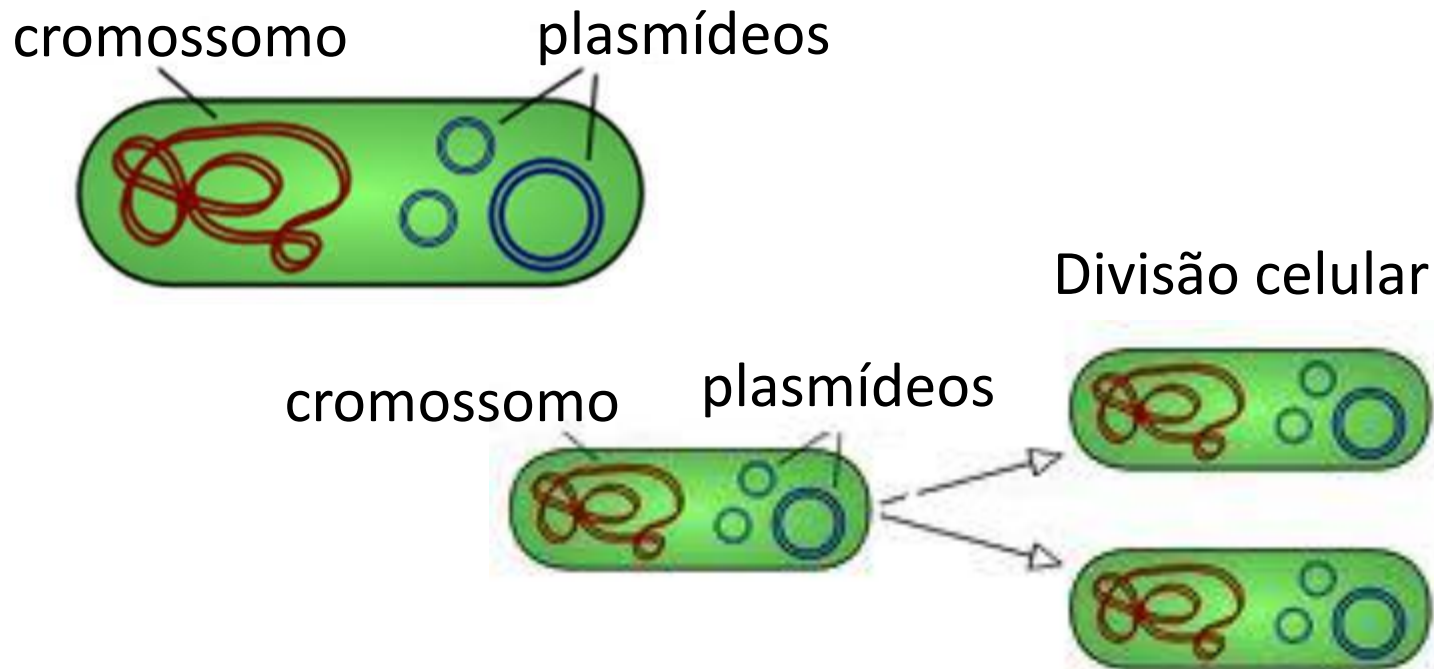


DNA recombinante



DNA ligase

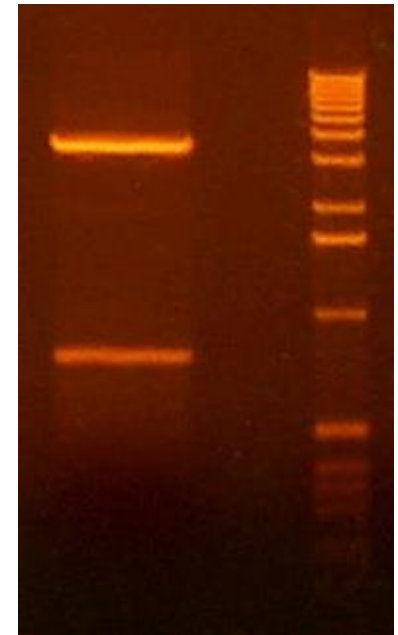
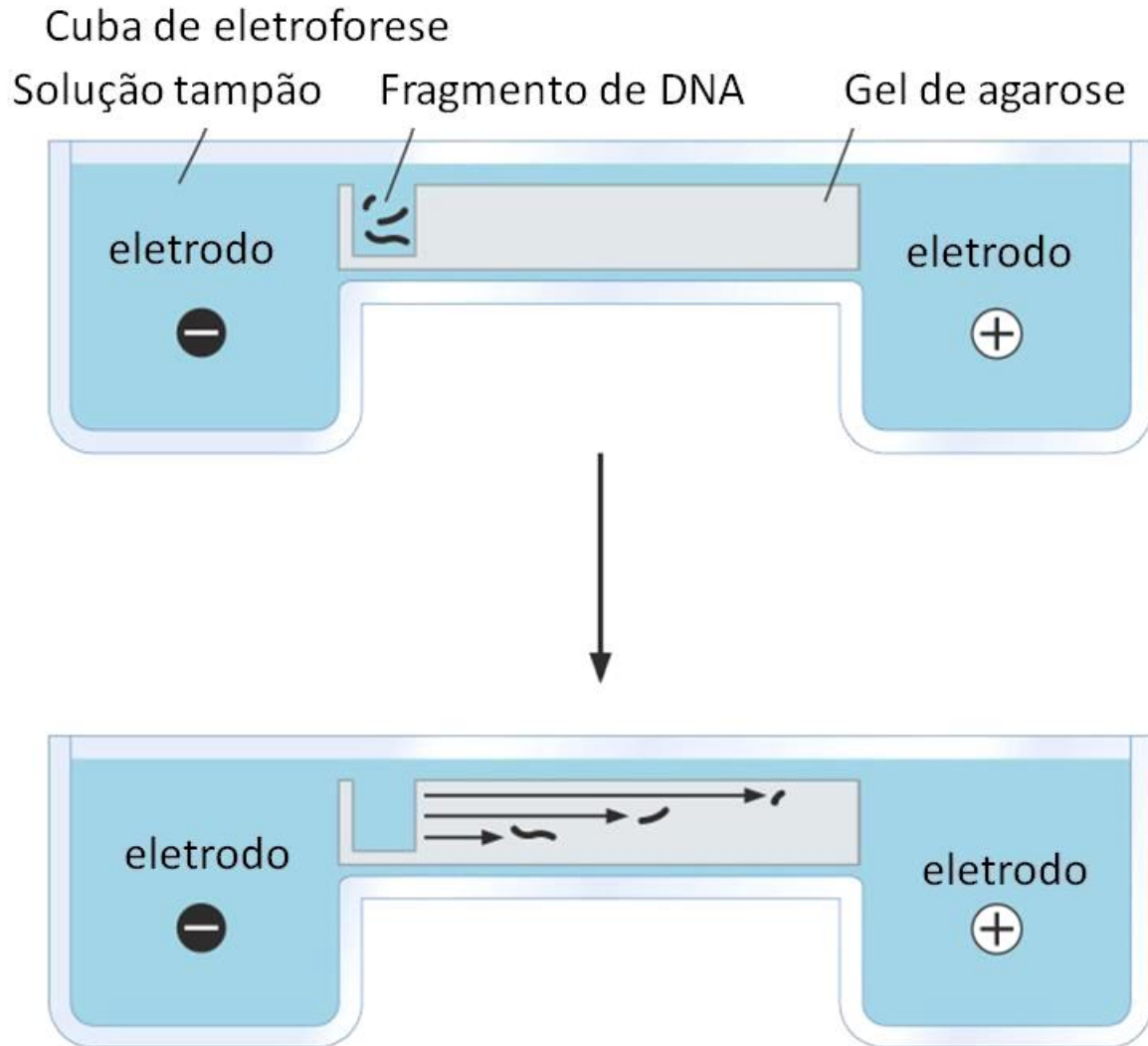
# PLASMÍDIOS COMO VETORES DE CLONAGEM

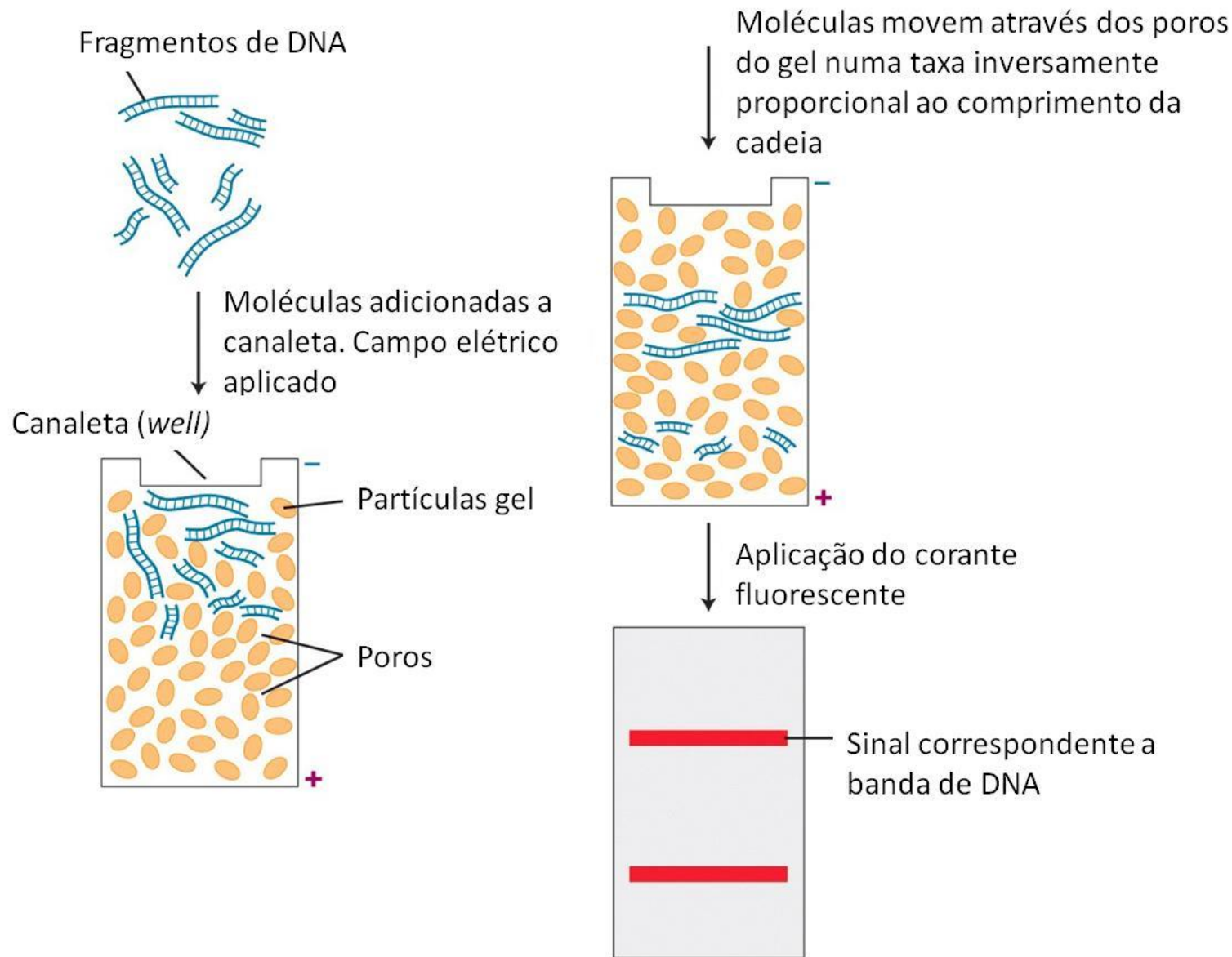


- ✓ ocorrem naturalmente em algumas bactérias;
- ✓ são moléculas de DNA dupla fita e circular;
- ✓ muitas vezes carregam genes para resistência a antibióticos;
- ✓ replicação independente da replicação cromossômica (apresentam uma origem de replicação independente).

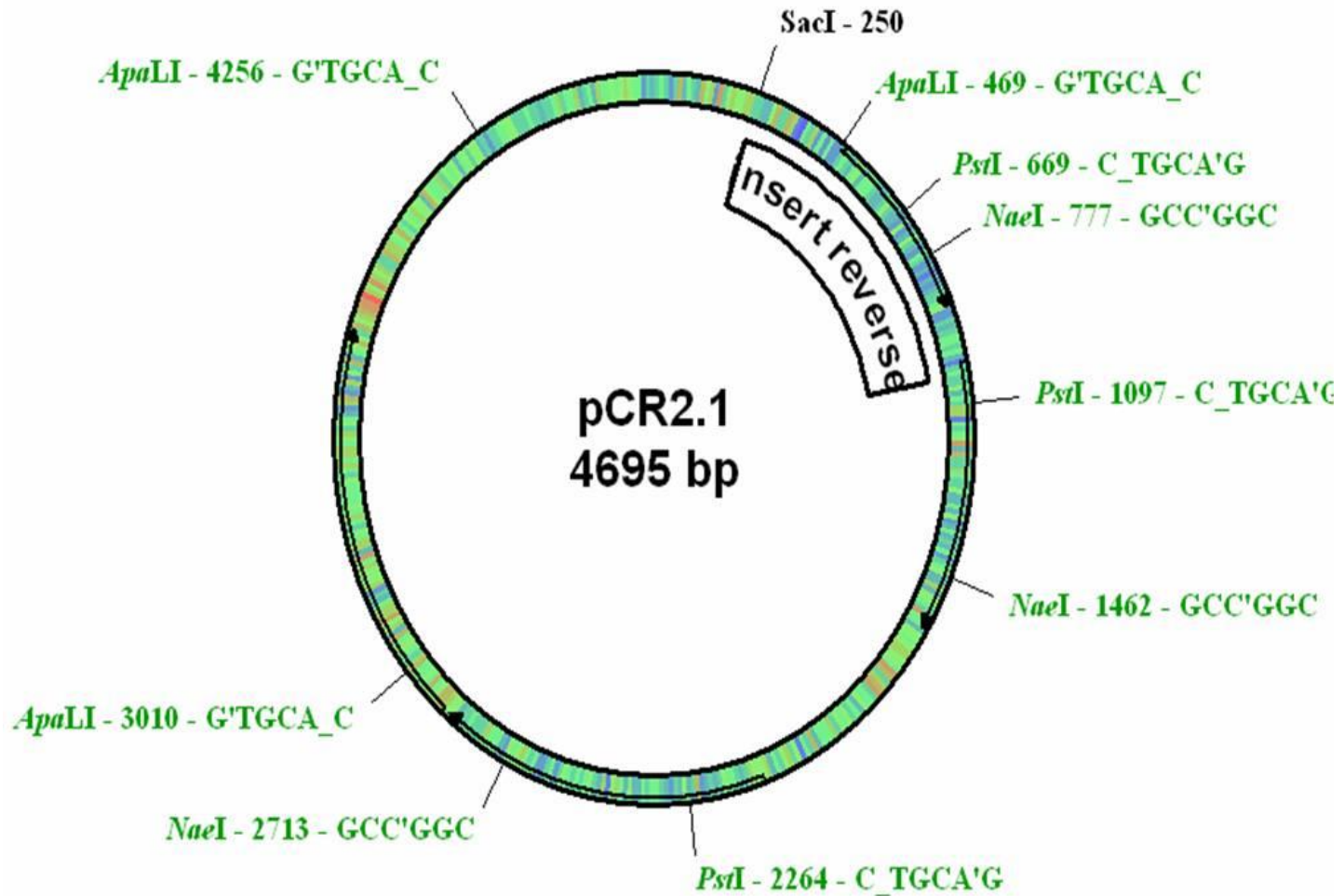


# ELETROFORESE

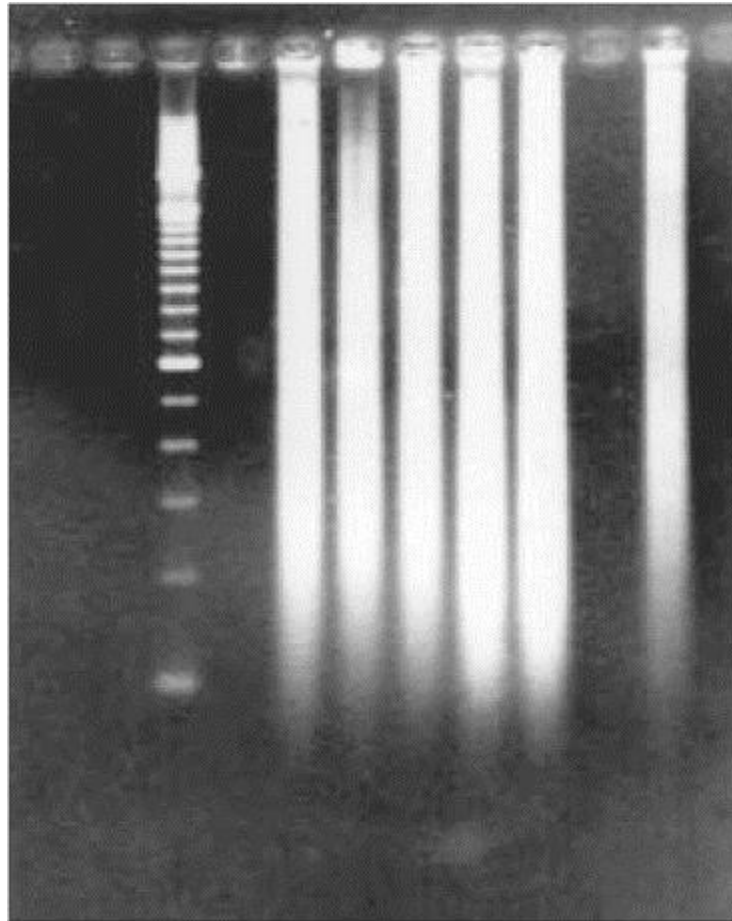




# VAMOS VER SE EU APRENDI....



# DNA GENÔMICO É DIFERENTE...MILHARES, BILHÕES DE PARES DE BASES...



**Figura 1** – Amostras de DNA total, extraídas de fragmentos de leiomiomas uterinos embebidos em parafina e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%

# ESTUDO DIRIGIDO

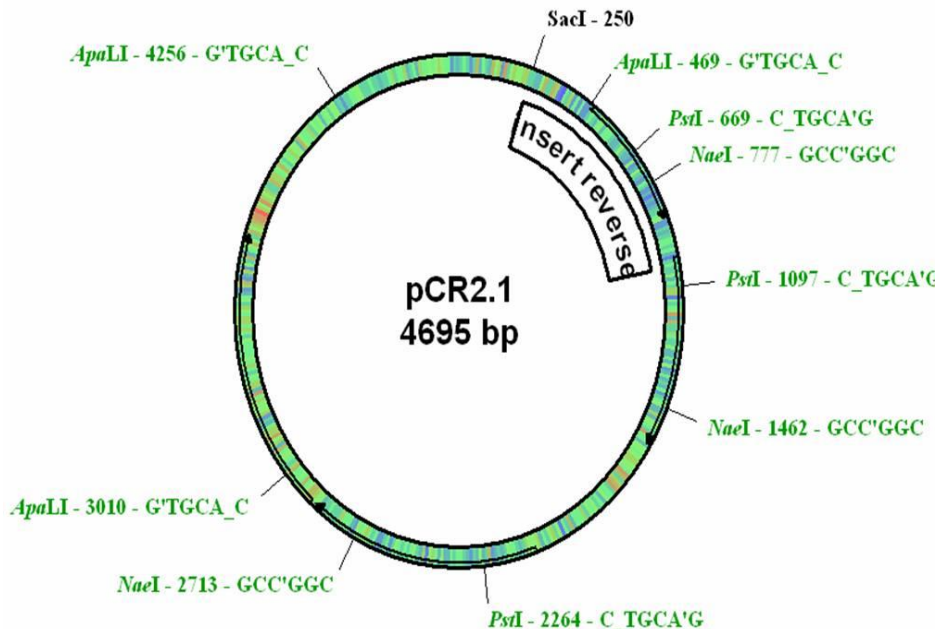
1. Principio da Tecnologia do DNA recombinante
2. Enzimas de restrição
3. Vetores de Clonagem
4. Eletroforese



# QUIZ 2

A partir do conhecimento da atividade das enzimas de restrição e utilizando as informações do plasmídio pCR2.1, responda as questões abaixo:

- O que são enzimas de restrição? De exemplo de 2 enzimas que fazem corte coesivo e duas que fazem corte cego.
- Esquematize no gel de agora abaixo os fragmentos gerados quando cortamos o plasmídio pCR2.1, com as enzimas *Pst*I, *Nae*I, *Apa*LI e *Sac*I, destacando o tamanho de cada fragmento gerado.



The diagram shows a schematic of a gel electrophoresis apparatus. It consists of a rectangular frame with four lanes at the top, each containing a horizontal line representing a well. The rest of the frame is empty, representing the gel area where the DNA fragments would be separated.