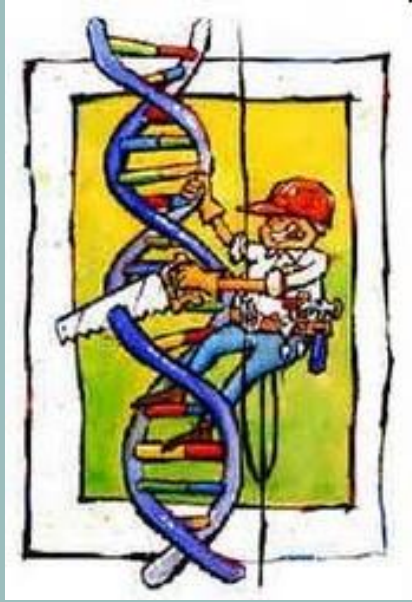


TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE



PARTE I

HISTÓRICO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO VETORES ELETROFORESE

Patricia Schaker

23.08.2017

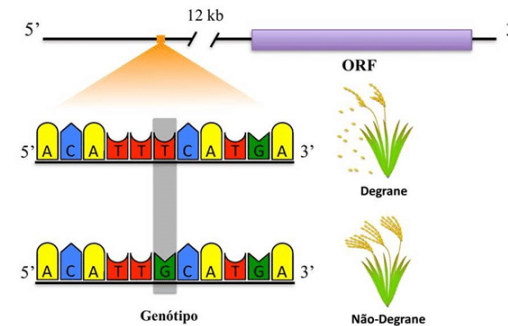
HOMO SAPIENS: UMA ESPÉCIE TECNOLÓGICA

- Antes mesmo do homem compreender os processos biológicos (hereditariedade, DNA, genes, proteínas), os recursos naturais já eram explorados e artificialmente selecionados.
- Requer variação genética.

Plantas

Animais

Micro-organismos



















SERES VIVOS: HEREDITARIEDADE E VARIAÇÃO

Mecanismos desconhecidos.

Cruzamentos experimentais → híbridos instáveis.

Resultados imprevisíveis e instáveis.

| 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 | |

MENDEL E AS LEIS DA HERANÇA

Resultados previsíveis e estáveis.

Manipulação de cruzamentos e melhoramento genético.

Tecnologia do DNA Recombinante:

- Conjunto de ferramentas moleculares (técnicas) que permitem identificar, isolar, modificar e multiplicar genes de quaisquer organismos
- A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a **clonagem molecular**. A clonagem de DNA a partir de qualquer organismo exige cinco etapas gerais:
 1. Corte do DNA em locais precisos (**Enzimas de restrição**).
 2. Seleção de uma pequena molécula de DNA capaz de autorreplicação (**vetores de clonagem**), que atuam como um carreador ou agente de entrega).
 3. Ligação de dois fragmentos de DNA covalentemente (**DNA-ligase**), dando origem ao DNA recombinante.
 4. Deslocamento do DNA recombinante do tubo de ensaio para um organismo hospedeiro. O organismo hospedeiro fornece a maquinaria enzimática para replicação do DNA. (**Transformação**)
 5. Seleção ou identificação de células hospedeiras que contêm o DNA recombinante.

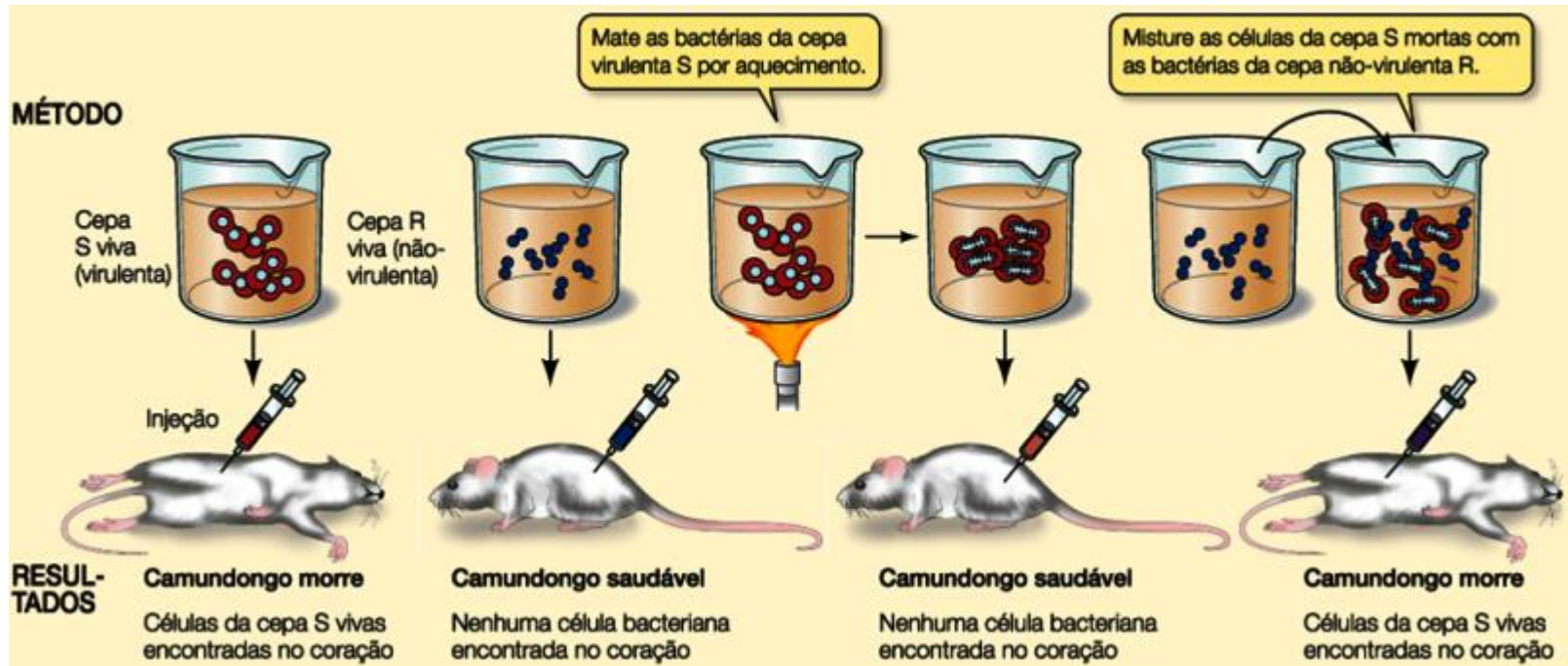
Os métodos usados para realizar essas tarefas e outras relacionadas são coletivamente referidos como **tecnologia do DNA recombinante** ou **engenharia genética**.



“PRINCÍPIO TRANSFORMANTE”



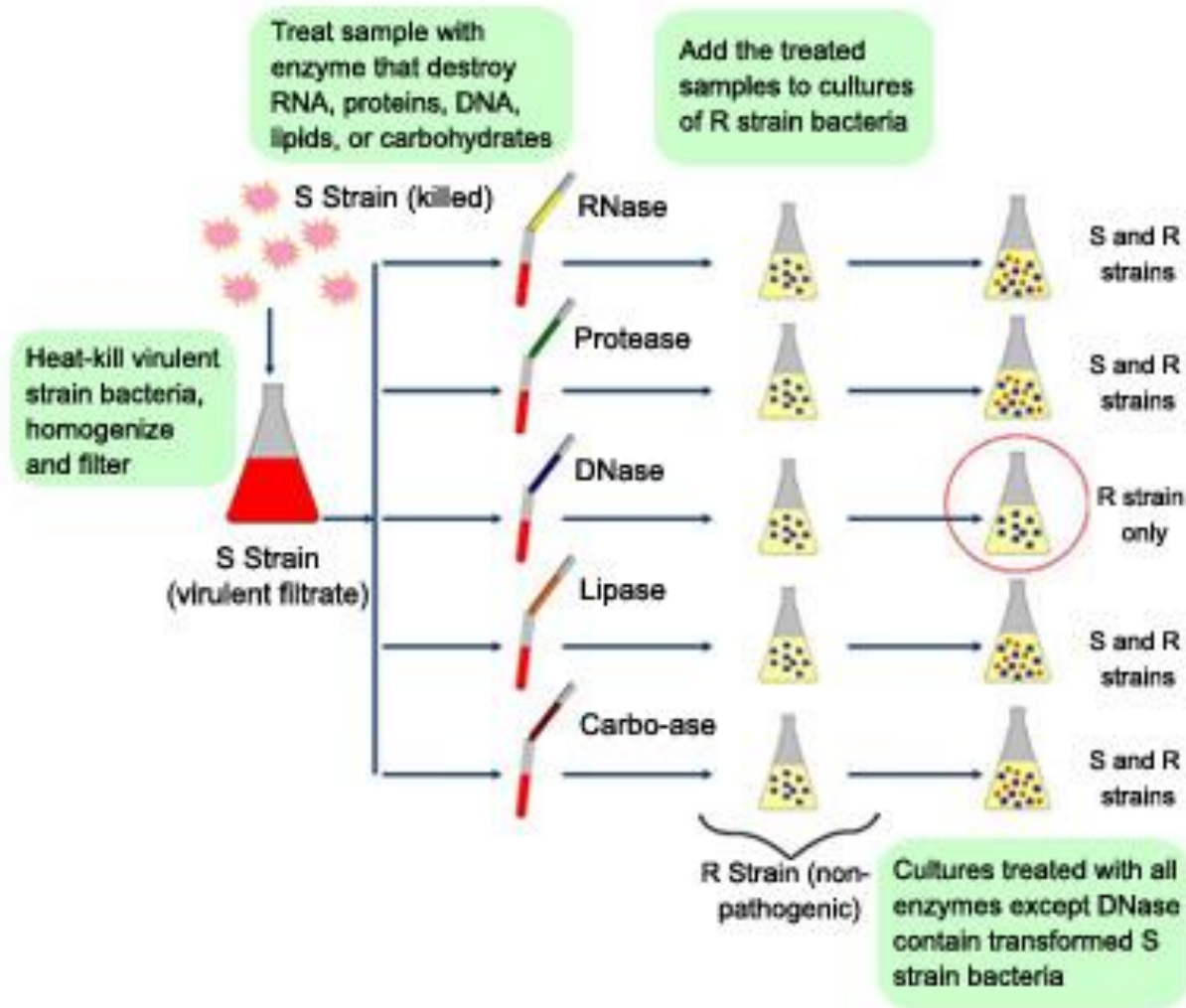
1928 - Experimento de Griffith



A experiência sugere que as bactérias do tipo S conseguiam transmitir a sua virulência às bactérias do tipo R (não virulentas) que se tornariam, assim, patogênicas. Esta informação deveria ser transmitida por uma substância química, que ficou conhecida por **princípio transformante**.

TRANSFERÊNCIA DE DNA NA NATUREZA

1944 - Avery: DNA era o “princípio transformante”



HISTÓRICO

1953 – Estrutura do DNA (Watson e Crick)

1956 – Isolamento da DNA polimerase (Kornberg)

1961 – Elucidação do processo de síntese de proteínas (Jacob e Monod)

1966 – Isolamento da DNA ligase (Weiss e Richardson)

1970 – Purifica-se a primeira enzima de restrição tipo II: o *Hind* II (Smith e Wilcox)

1972 - Paul Berg: enzima de restrição, DNA ligase:

Primeira molécula de DNA recombinante

Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*

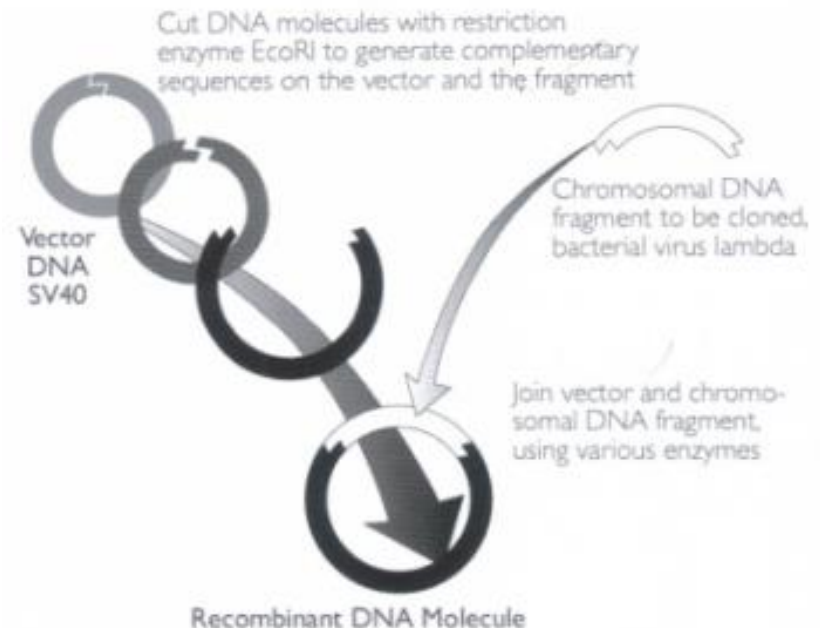
(molecular hybrids/DNA joining/viral transformation/genetic transfer)

DAVID A. JACKSON*, ROBERT H. SYMONS†, AND PAUL BERG

Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305

Contributed by Paul Berg, July 31, 1972

ABSTRACT We have developed methods for covalently joining duplex DNA molecules to one another and have used these techniques to construct circular dimers of SV40 DNA and to insert a DNA segment containing lambda phage genes and the galactose operon of *E. coli* into SV40 DNA. The method involves: (a) converting circular SV40 DNA to a linear form, (b) adding single-stranded homodeoxypolymeric extensions of defined composition and length to the 3' ends of one of the DNA strands with the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase (c) adding complementary homodeoxypolymeric extensions to the other DNA strand, (d) annealing the two DNA molecules to form a circular duplex structure, and (e) filling the gaps and sealing nicks in this structure with *E. coli* DNA polymerase and DNA ligase to form a covalently closed-circular DNA molecule.



1973 – Primeiro organismo geneticamente modificado

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 70, No. 11, pp. 3240-3244, November 1973

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

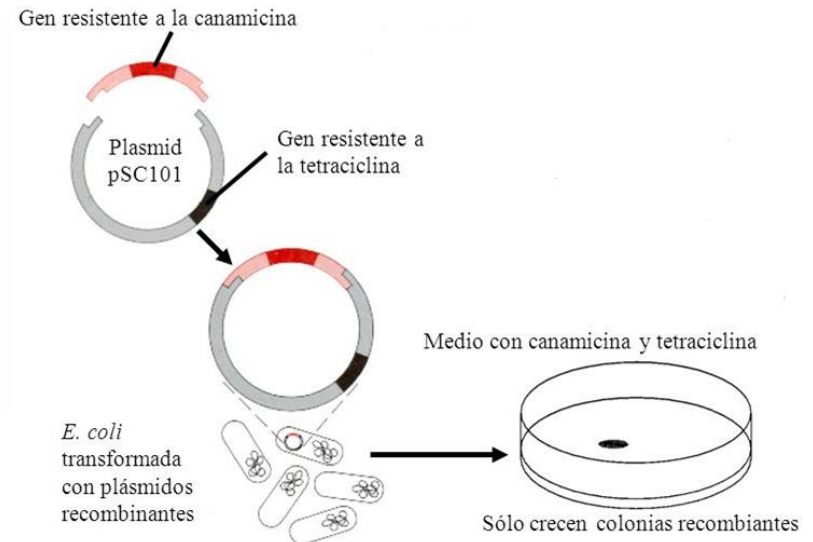
(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

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



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 fragments of larger replicons, as well as by joining of plasmid DNA molecules of entirely different origins.



1973 – Transferência de DNA de eucarioto para procarioto

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 71, No. 5, pp. 1743–1747, May 1974

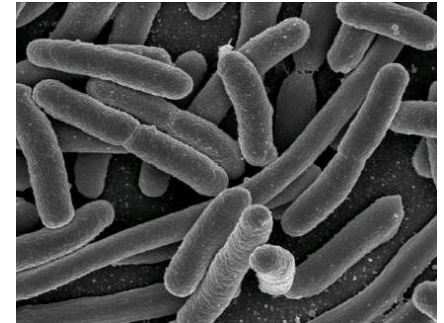
Replication and Transcription of Eukaryotic DNA in *Escherichia coli*

(restriction/plasmid/transformation/recombination/ribosomal DNA)

JOHN F. MORROW*†‡, STANLEY N. COHEN†, ANNIE C. Y. CHANG†, HERBERT W. BOYER§, HOWARD M. GOODMAN¶, AND ROBERT B. HELLING§||

Departments of *Biochemistry and †Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and Departments of §Microbiology and ¶Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, Calif. 94143

ABSTRACT Fragments of amplified *Xenopus laevis* DNA, coding for 18S and 28S ribosomal RNA and generated by *EcoRI* restriction endonuclease, have been linked *in vitro* to the bacterial plasmid pSC101; and the recombinant molecular species have been introduced into *E. coli* by transformation. These recombinant plasmids, containing both eukaryotic and prokaryotic DNA, replicate stably in *E. coli*. RNA isolated from *E. coli* minicells harboring the plasmids hybridizes to amplified *X. laevis* rDNA.



Como obter um DNA recombinante?

DNA recombinante é feito pela separação de um fragmento de DNA de interesse de um doador e sua ligação em uma molécula de DNA pequena de replicação rápida (vetor)

Organismo de interesse



Extração do DNA total



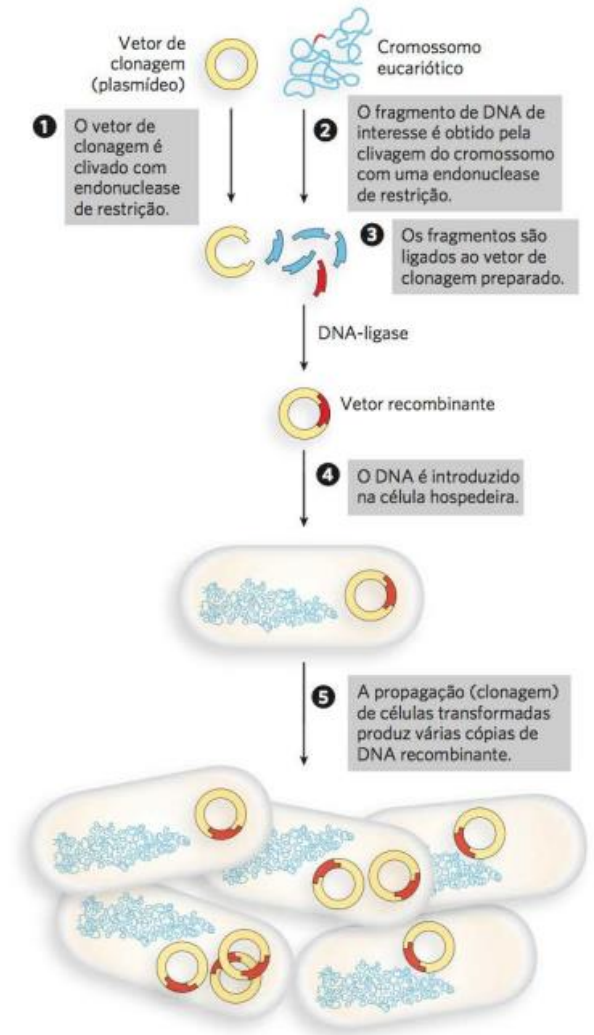
Clivagem do DNA genômico ou PCR



Ligação dos fragmentos em vetores



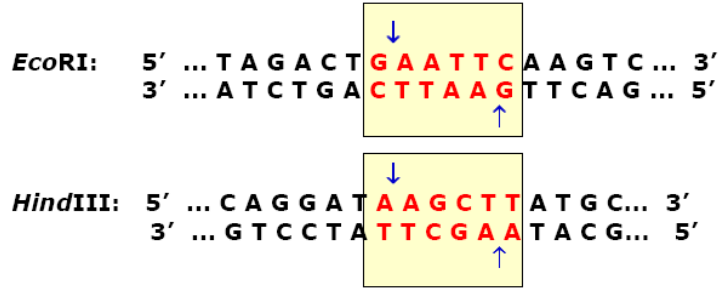
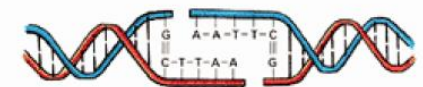
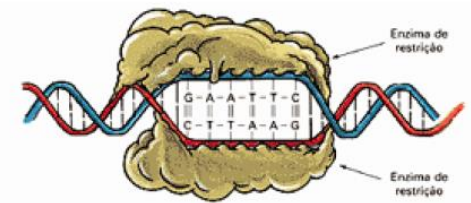
Armazenamento dos vetores em hospedeiros



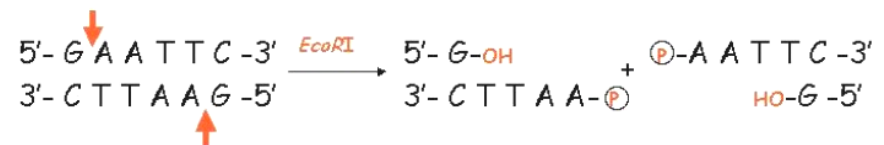
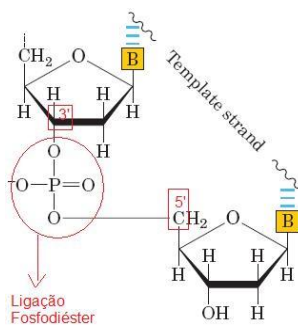


Enzimas de restrição: tesoura biológica

- Endonuclease de restrição (Endo = dentro; nuclease= quebra)
- Proteínas que reconhecem e clivam (CORTAR) a molécula de DNA em seqüências específicos (**sítios de restrição**), geralmente de 4, 6 e 8 pares de bases (pb) - **seqüências palíndromicas**



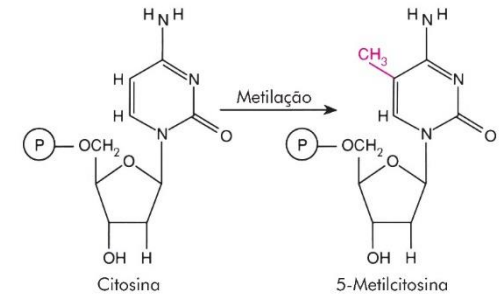
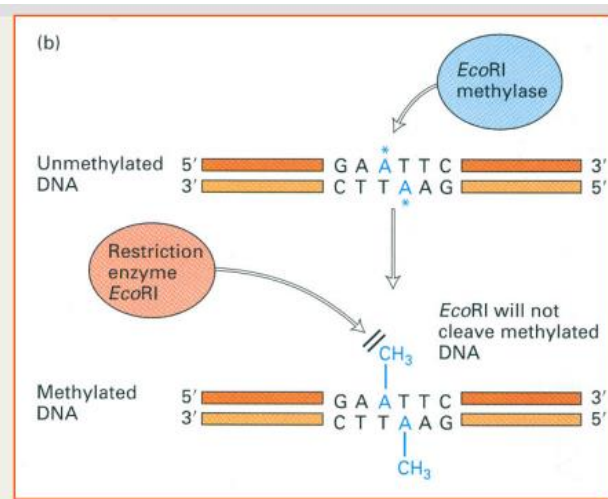
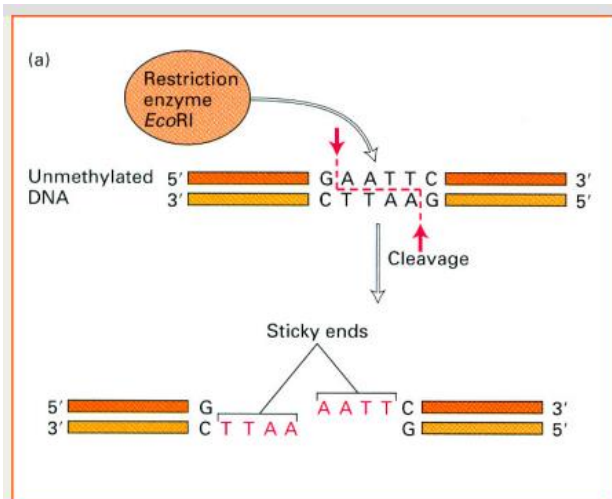
- Cliva o DNA nas ligações fosfodiester





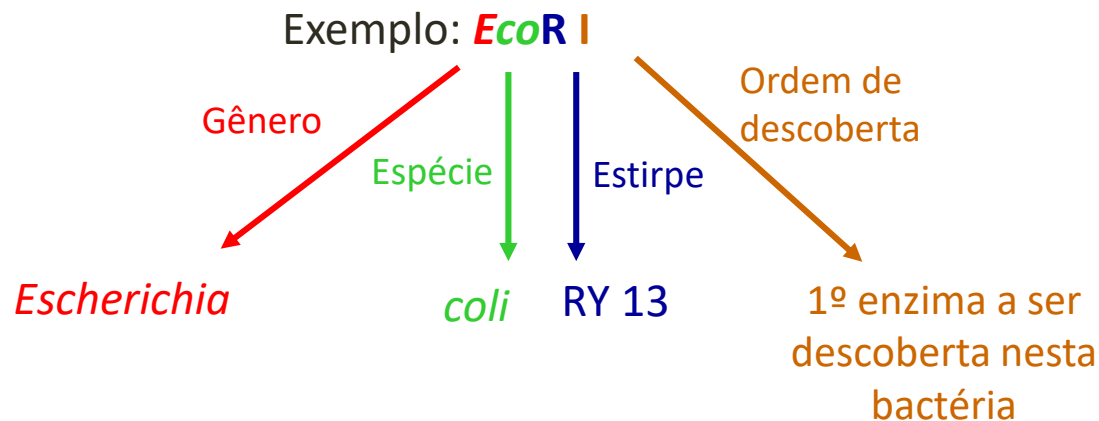
Enzimas de restrição

- Naturalmente produzidas por bactérias: mecanismo de defesa contra fagos
- Diferentes linhagens de bactérias produzem diferentes enzimas de restrição
- ✿ Sistema de restrição/modificação: combinação de enzimas de restrição com metilases
 - ✓ hidrólise do DNA “estranho”
 - ✓ proteção do DNA celular relativamente as enzimas de restrição através da adição de grupos metil às bases A ou C
 - ✓ DNA metilase possui a mesma sequência de reconhecimento que os enzimas de restrição



Nomenclatura das enzimas de restrição

- O nome da enzima é derivado do nome da linhagem e espécie bacteriana em que foi isolada:



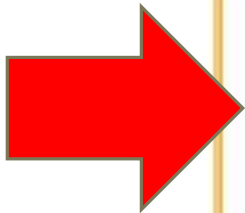
BamHI: *Bacillus amyloliquefaciens*

HaellI: *Haemophilus aegyptius*

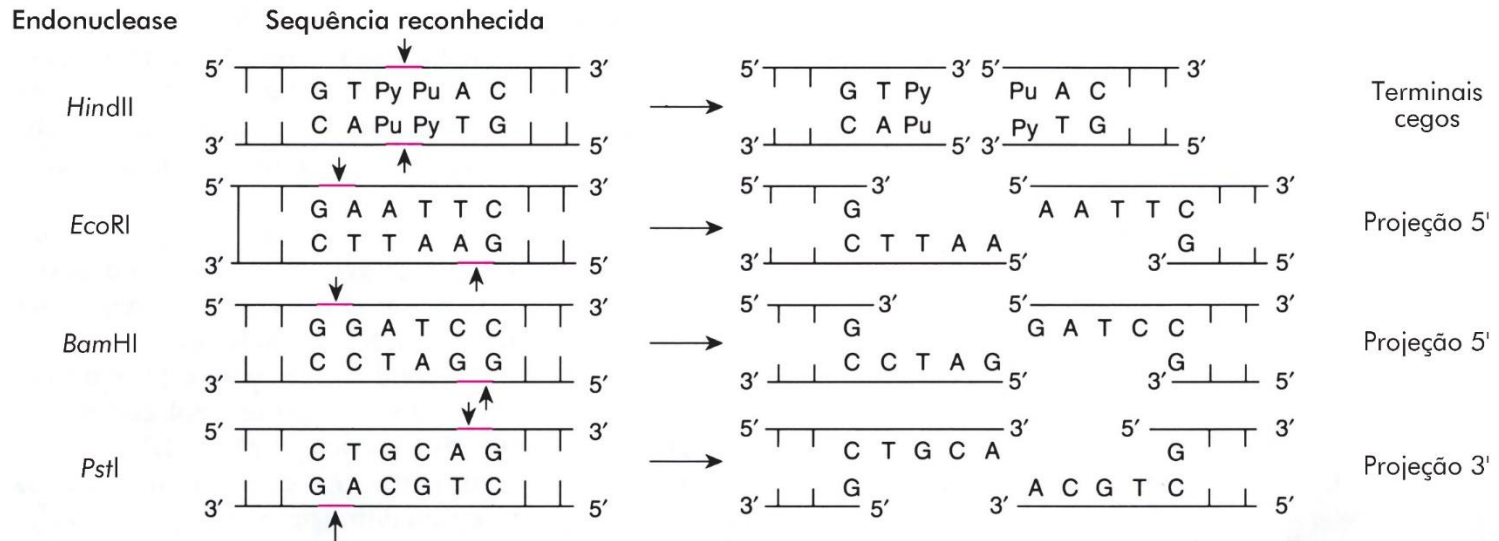
PstI: *Providencia stuartii*

Tipos de enzimas de restrição

| Types of restriction enzymes | | | |
|------------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------------------------|
| Type | Activity of Enzyme | ATP Required | Cleavage Site |
| I | Cleavage and methylation | Yes | Random sites distant from recognition site |
| II | Cleavage only | No | Within recognition site |
| III | Cleavage and methylation | Yes | Random sites near recognition site |



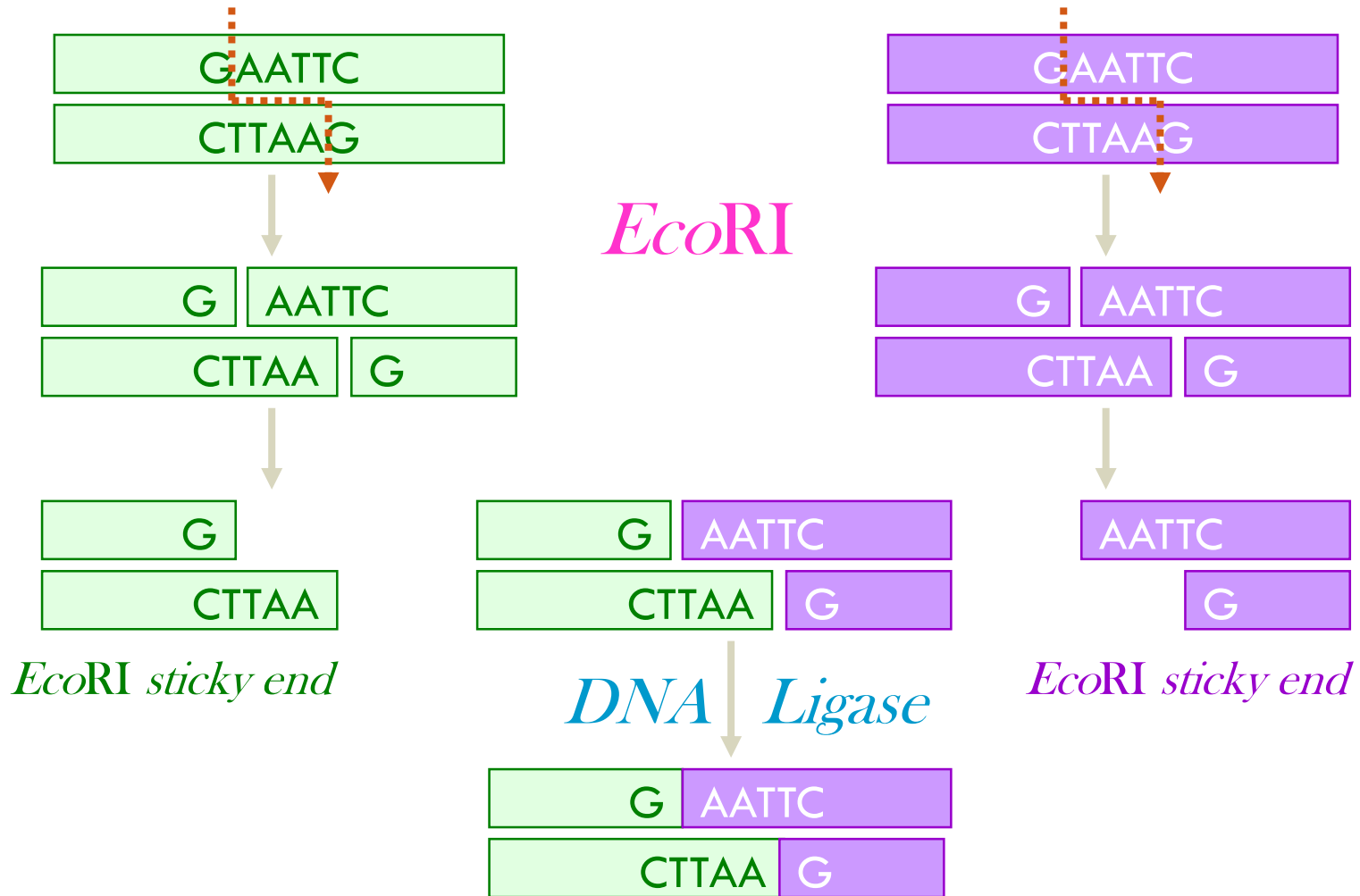
Enzimas de restrição: extremidades coesivas e extremidades cegas



Enzimas de restrição: extremidades coesivas e extremidades cegas

| Enzimas de restrição | Origem | Sequência de restrição | Extremidade |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| BamHI | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- | Sticky |
| EcoRI | <i>Escherichia coli</i> | -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- | Sticky |
| HindIII | <i>Haemophilus influenzae</i> | -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- | Sticky |
| KpnI | <i>Klebsiella pneumonia</i> | -G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G- | Sticky |
| PstI | <i>Providencia stuartii</i> | -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- | Sticky |
| SacI | <i>Streptomyces achromogenes</i> | -G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G- | Sticky |
| SalI | <i>Streptomyces albue</i> | -G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G- | Sticky |
| SmaI | <i>Serratia marcescens</i> | -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- | Blunt |
| SphI | <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> | -G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G- | Sticky |
| XbaI | <i>Xanthomonas badrii</i> | -T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T- | Sticky |

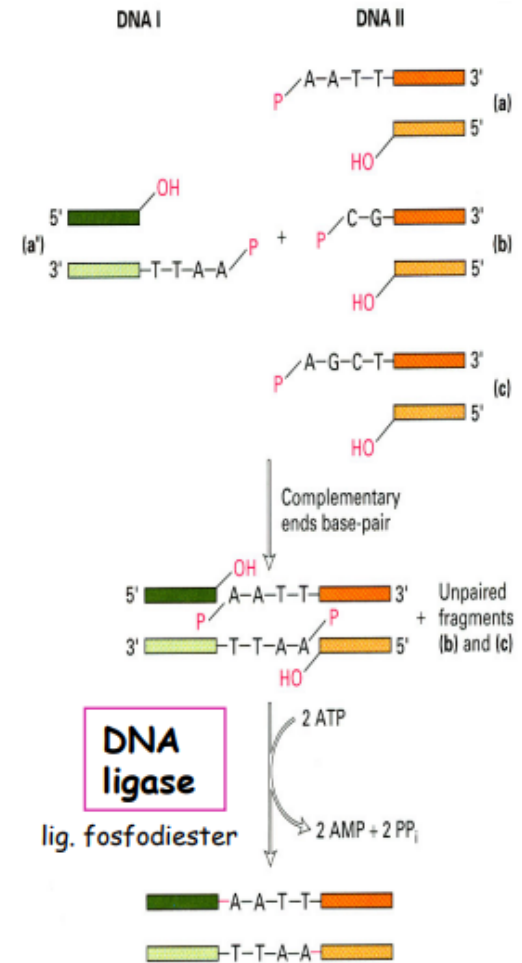
Enzimas de restrição otimizam a produção do DNA recombinante



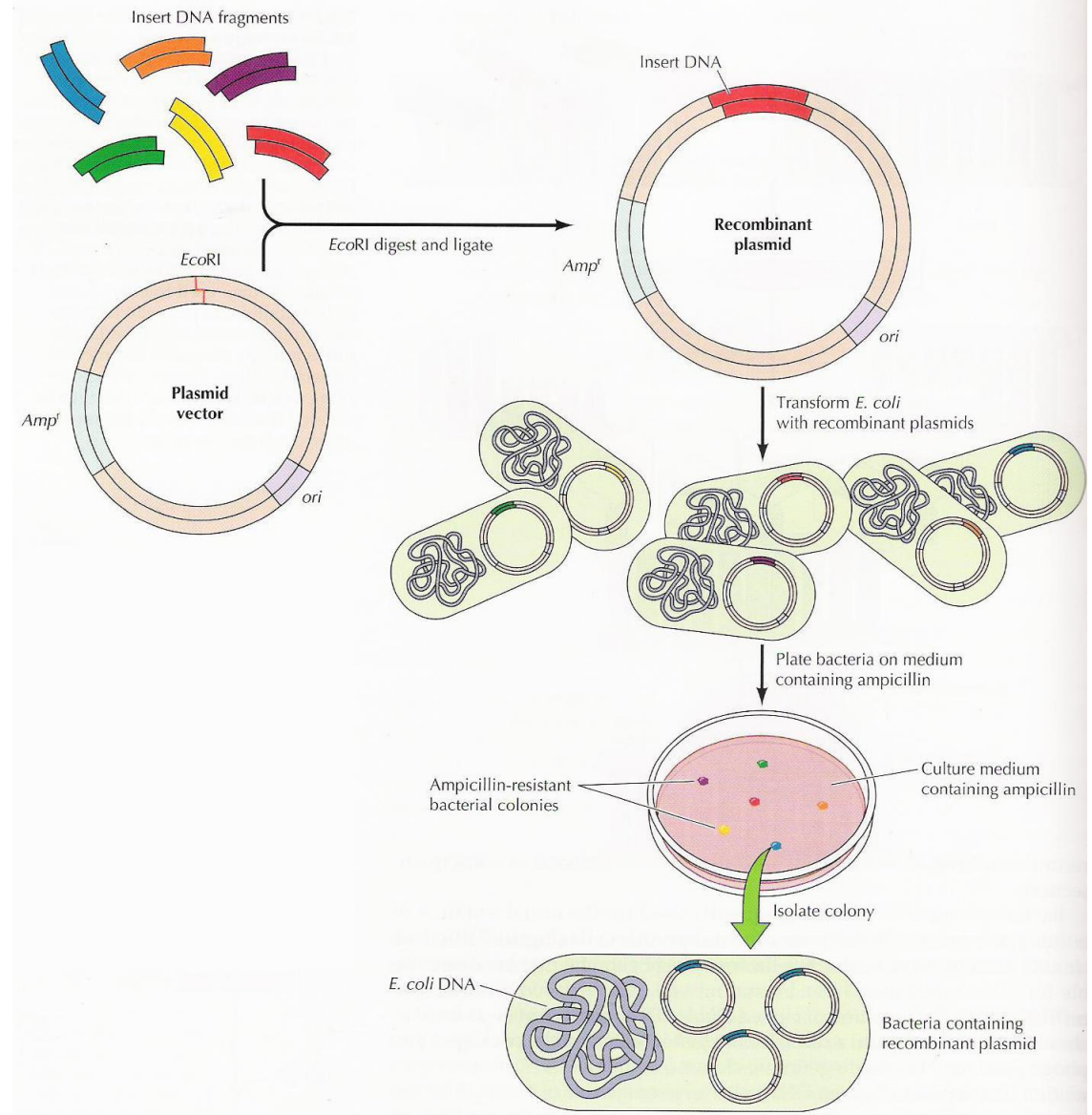
DNA ligase

As extremidades obtidas por corte com uma determinada enzima (compatíveis) emparelham e a sua ligação com a DNA ligase reconstitui a molécula de DNA

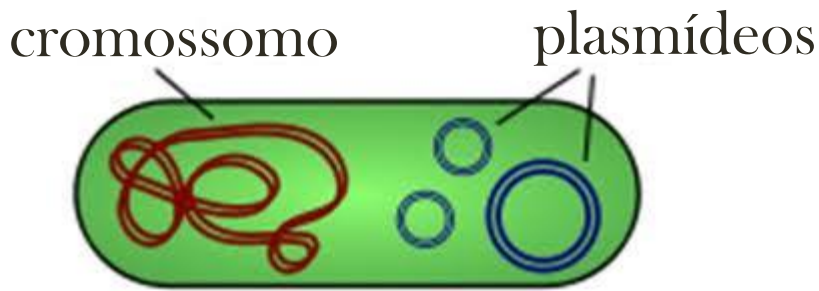
- Para refazer a ligação fosfodiester é necessário ATP



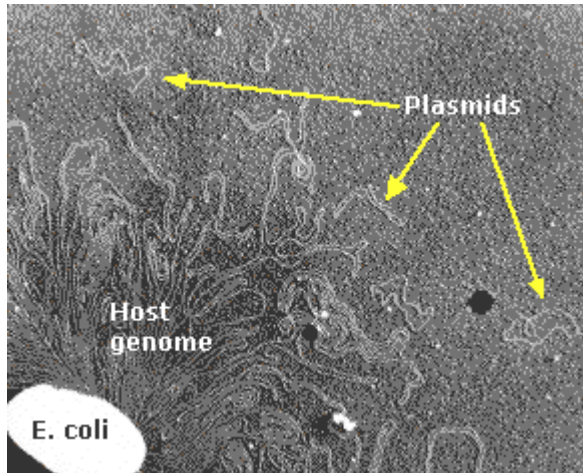
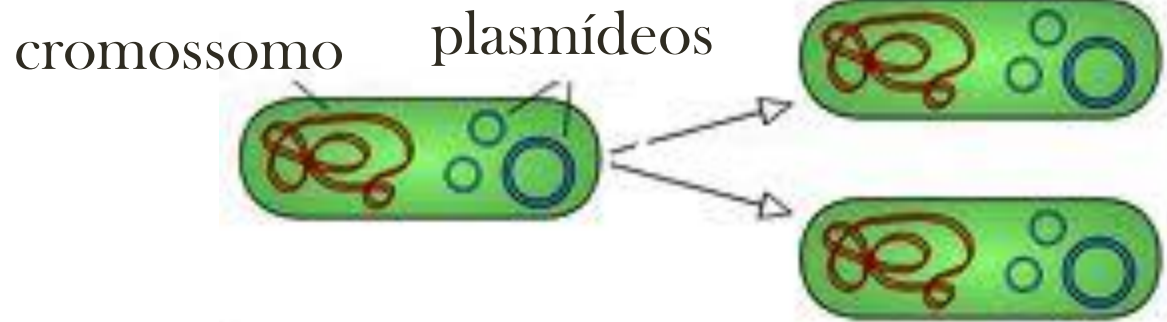
VETORES



VETORES



Divisão celular



- ✓ 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).

CONJUGAÇÃO BACTERIANA

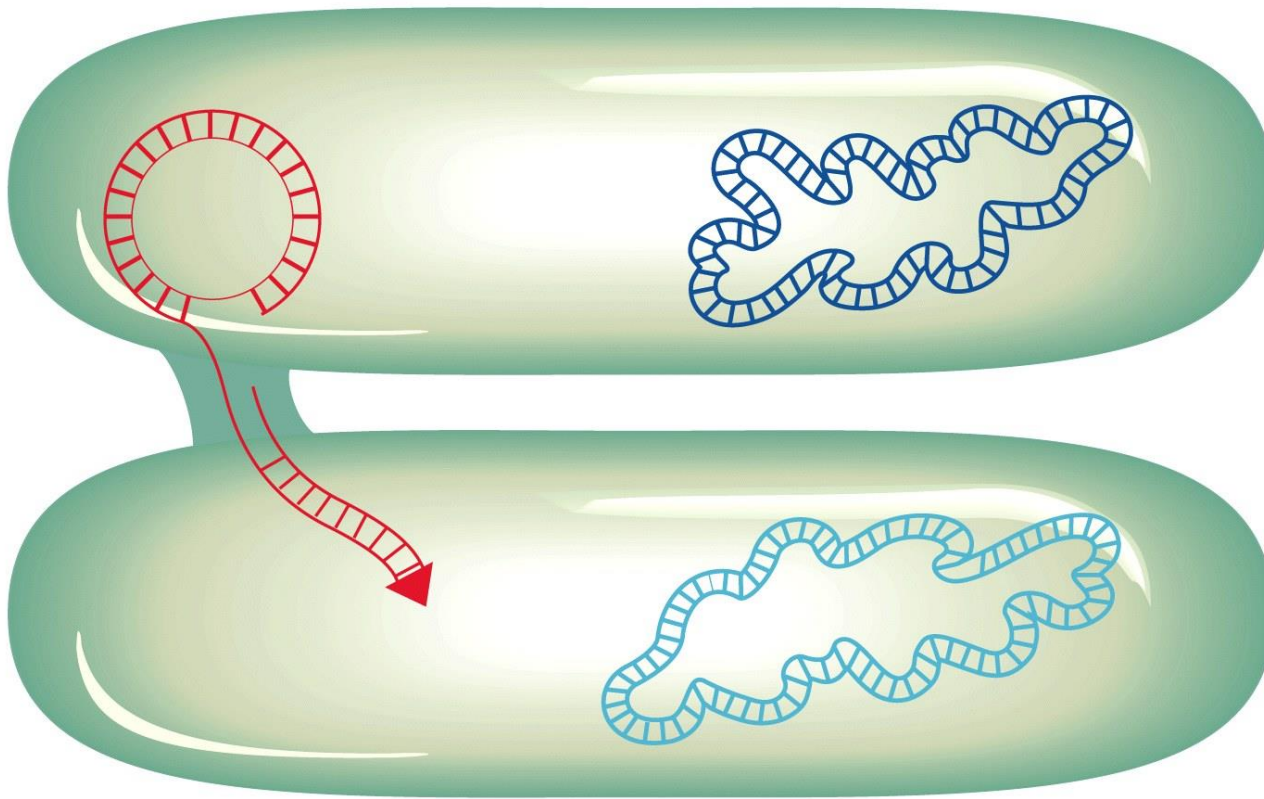
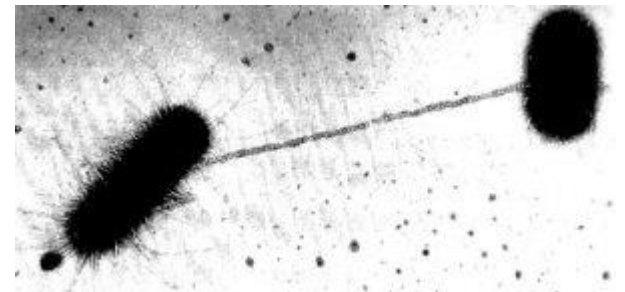


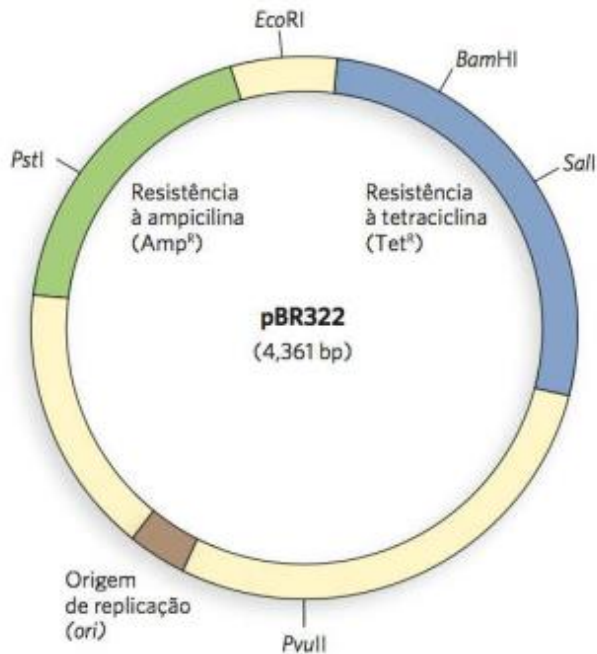
Figure 5-8b
Introduction to Genetic Analysis, Tenth Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company



Vetores de clonagem

Plasmídeos modificados que permitem a construção de um DNA recombinante

1. devem apresentar origem de replicação;
2. devem apresentar um gene para seleção (gene para resistência a antibiótico);
3. devem apresentar múltiplos sítios de clonagem (*poly-linker*)



✓ Origem de replicação

✓ Genes para
resistência a
antibióticos

Permite que a célula
hospedeira cresça em
meio seletivo

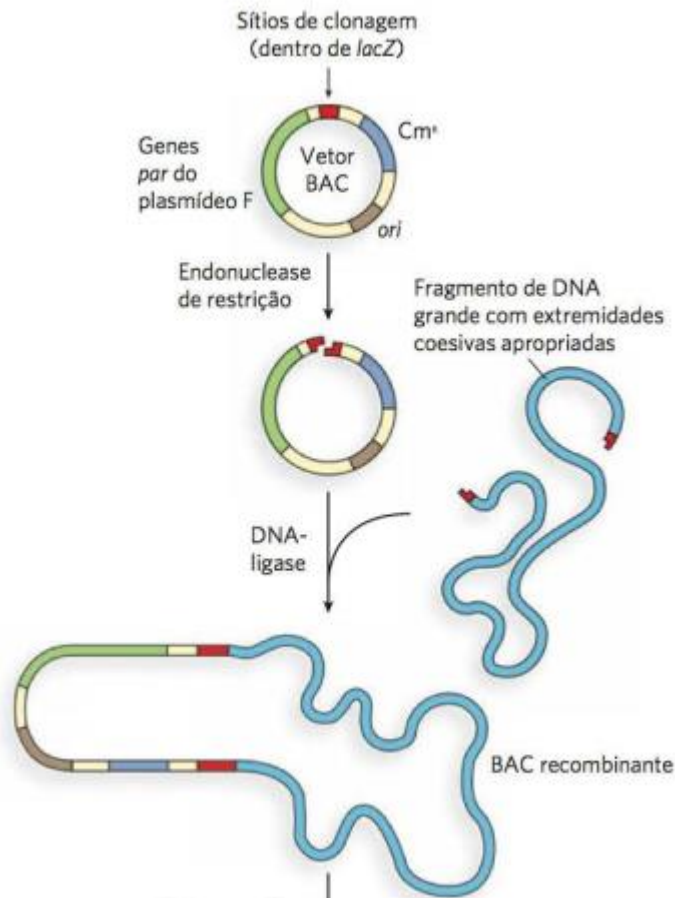
✓ Múltiplos sítios
de clonagem

Permite a inserção de
DNA exógeno

Vetores de clonagem

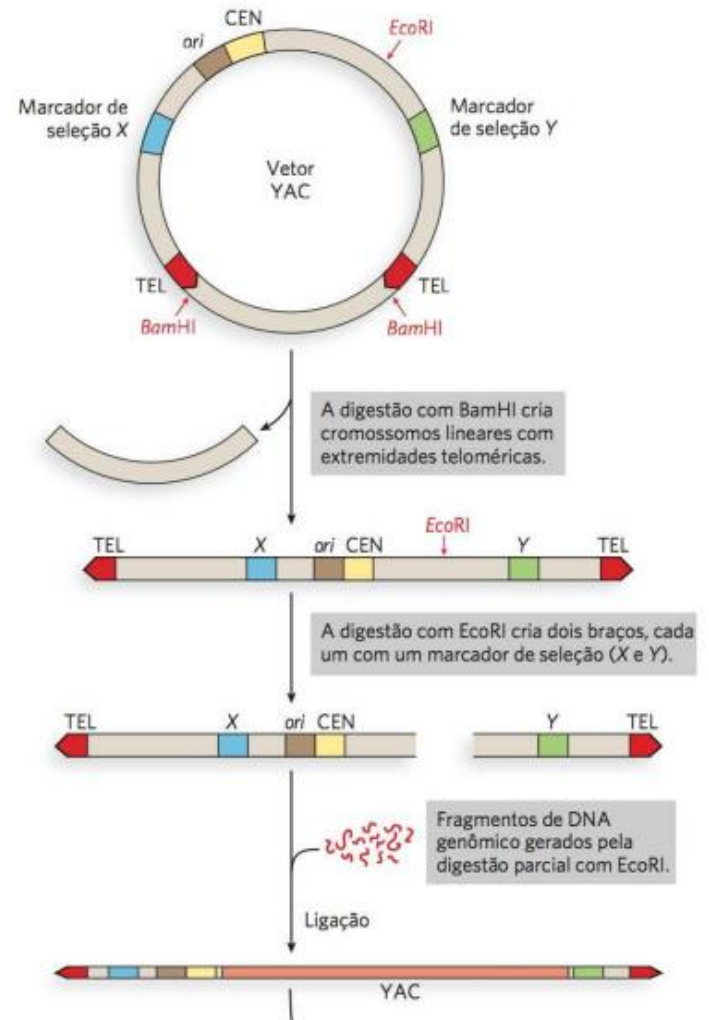
BAC – Cromossomo artificial bacteriano

DNA muito longos (normalmente
100.000 a 300.000 pb)

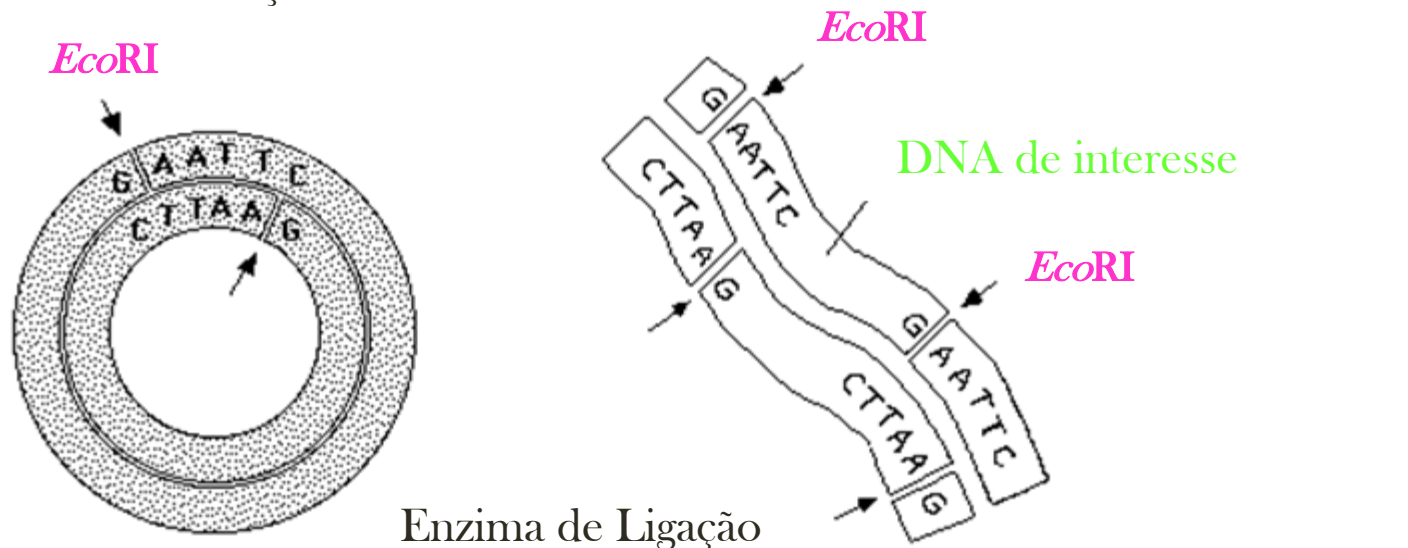


YAC – Cromossomo artificial de levedura

(inserto até cerca de 2×10^6 pb)



Enzima de Restrição

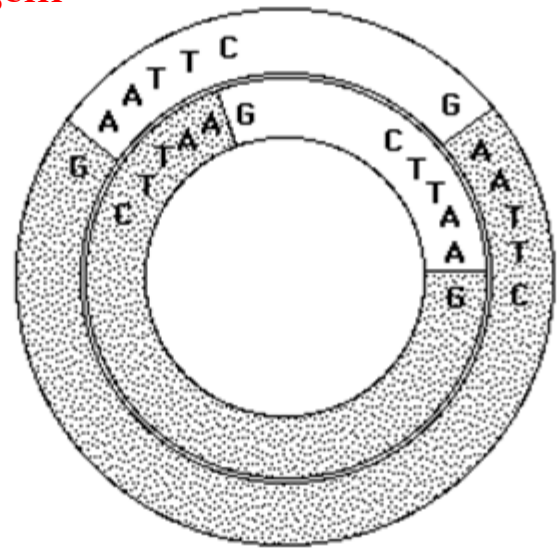


Enzima de Ligação

Vetor de clonagem

Extremidades coesivas

Ligação

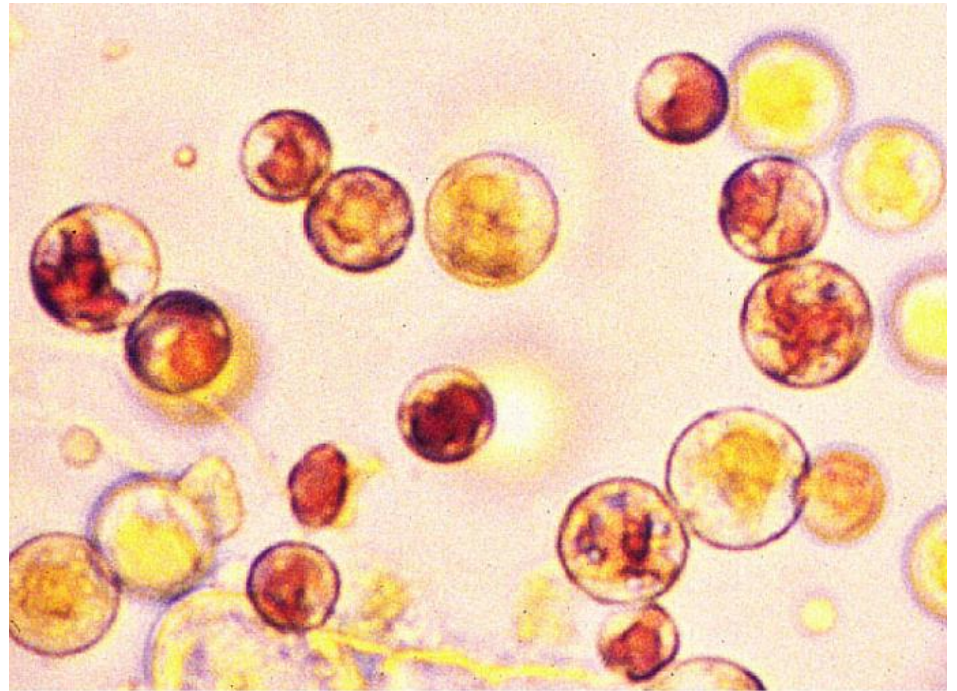


DNA recombinante

TRANSFORMAÇÃO

Inserção do DNA dentro da célula bacteriana — PRÓXIMA AULA

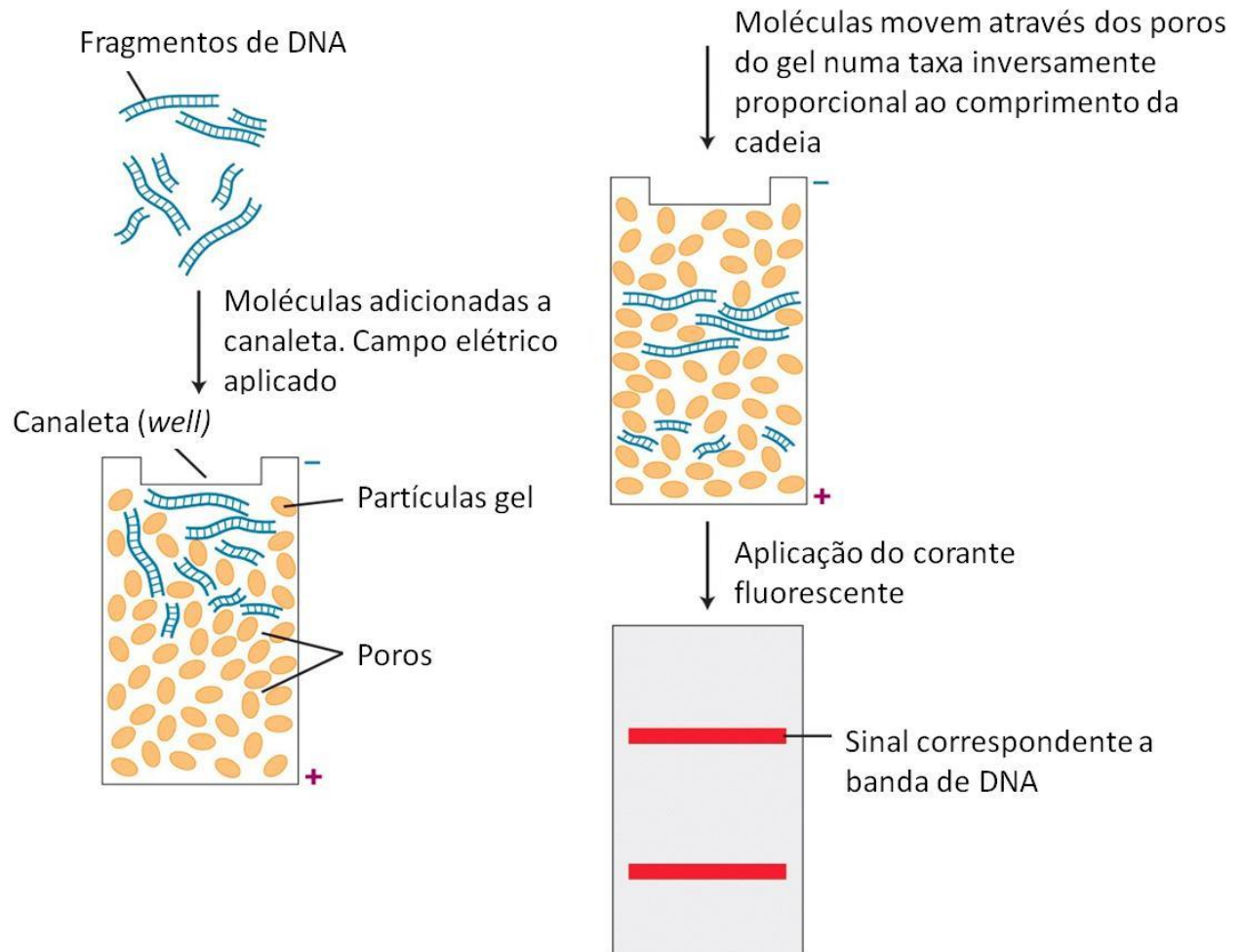
- Transformação química
- Eletroporação



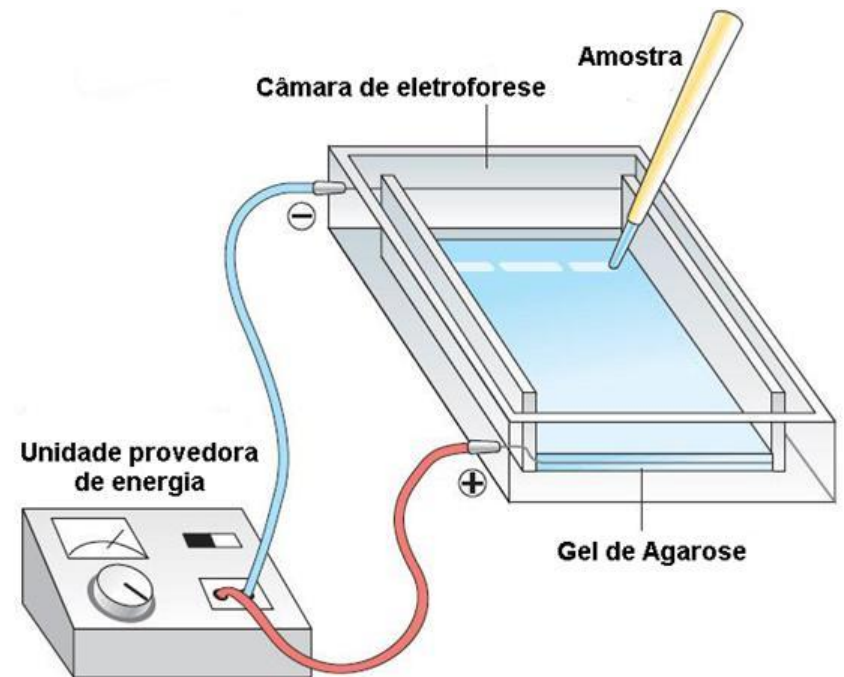
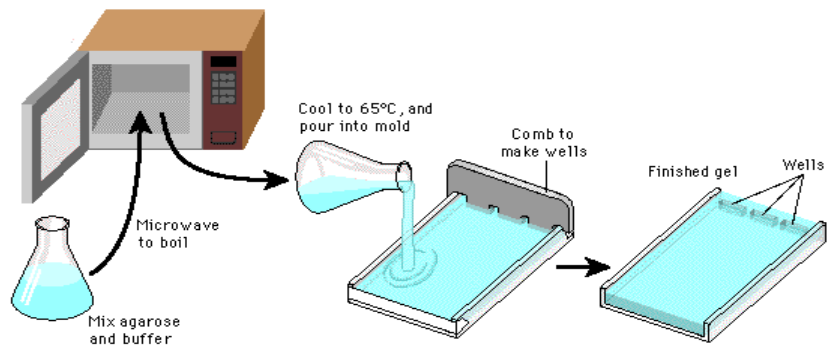
ELETROFORESE

COMO VISUALIZAR O DNA? **ELETROFORESE**

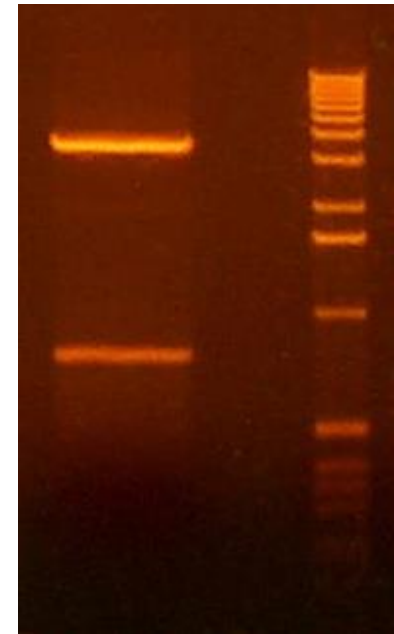
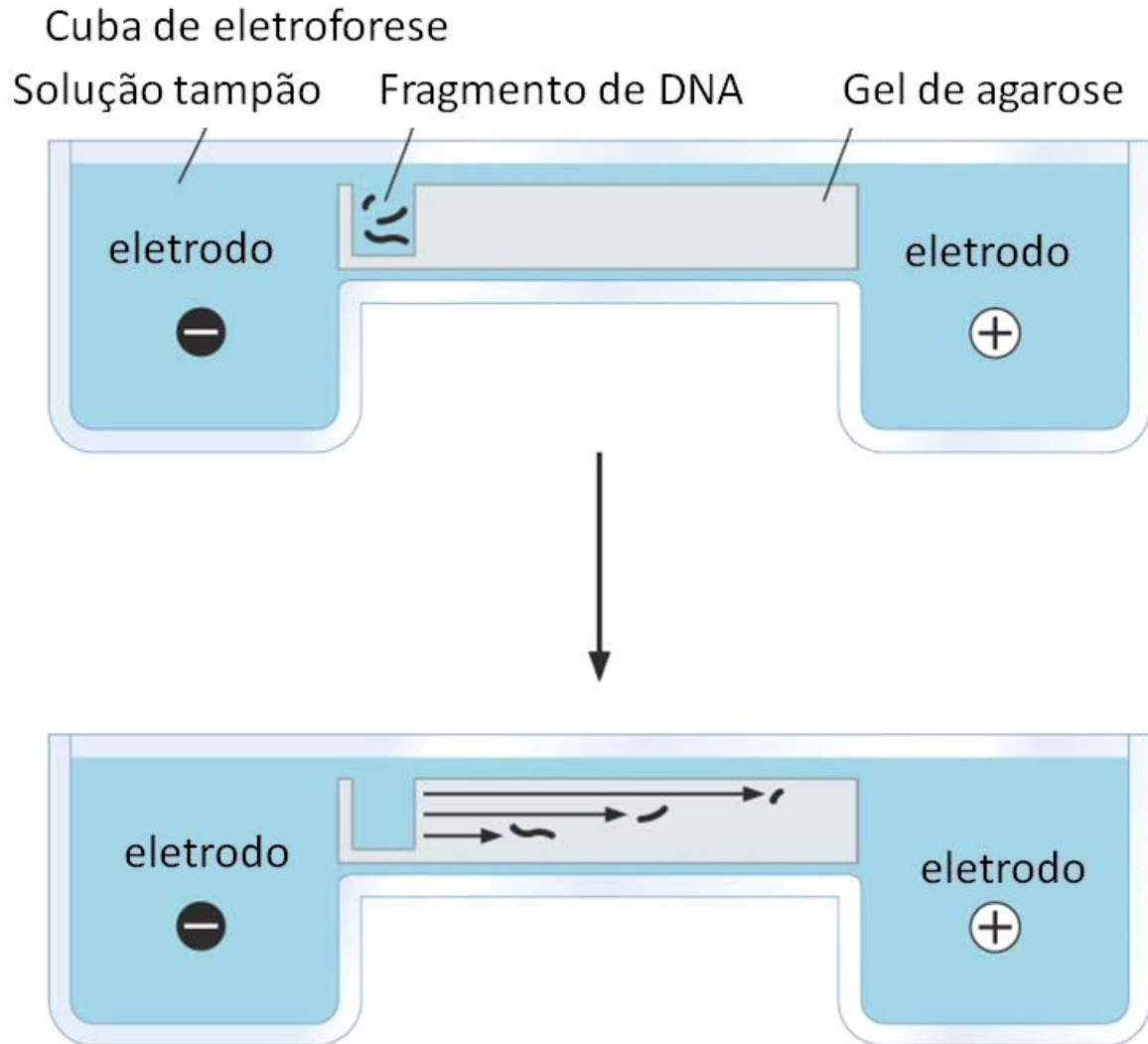
Permite a separação de moléculas de DNA de acordo com o tamanho dos fragmentos

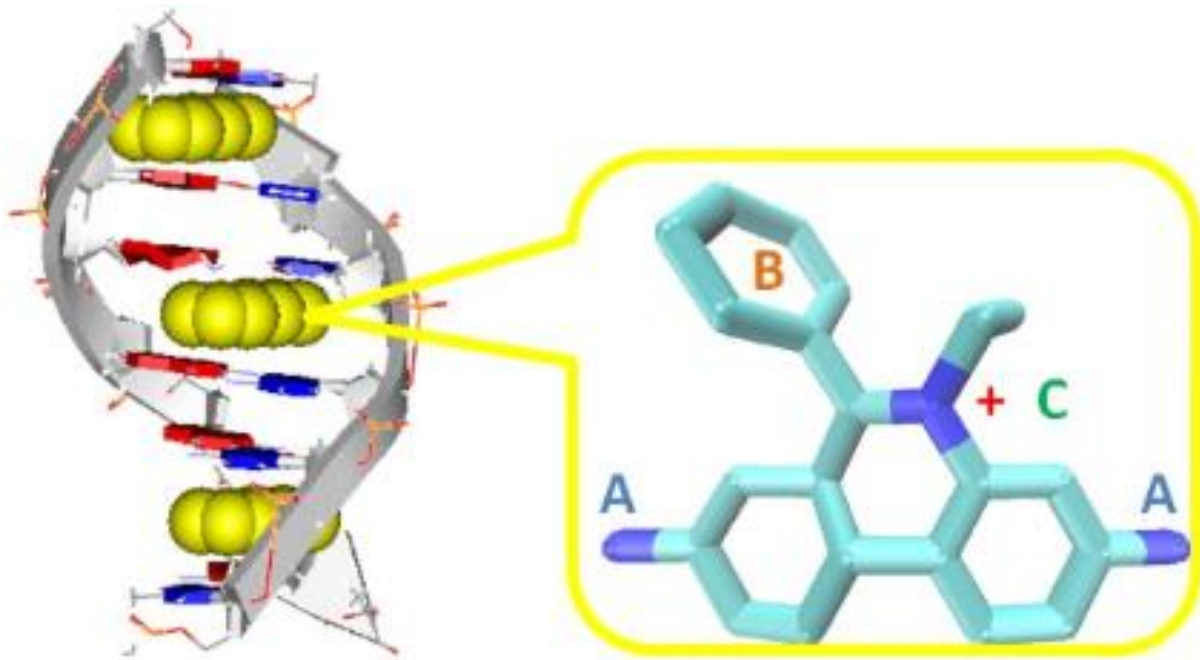


ELETROFORESE

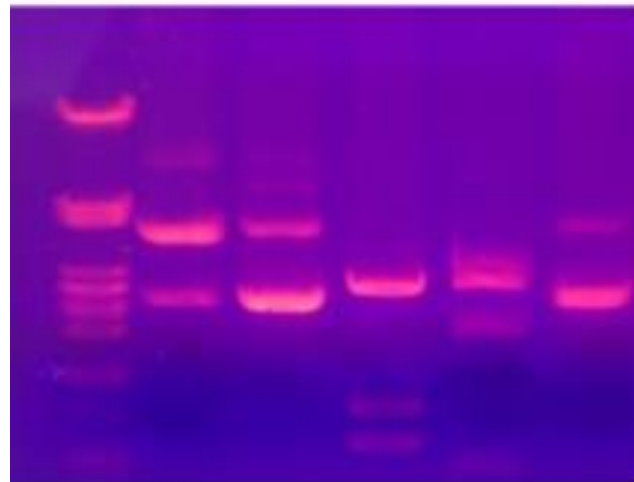


ELETOFORESE



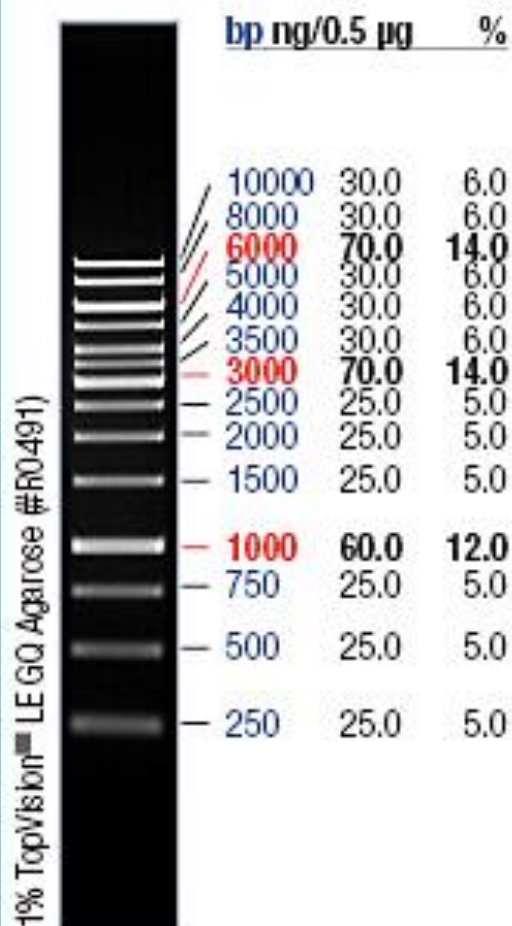


Brometo de etideo – molécula que intercala o DNA e é fluorescente

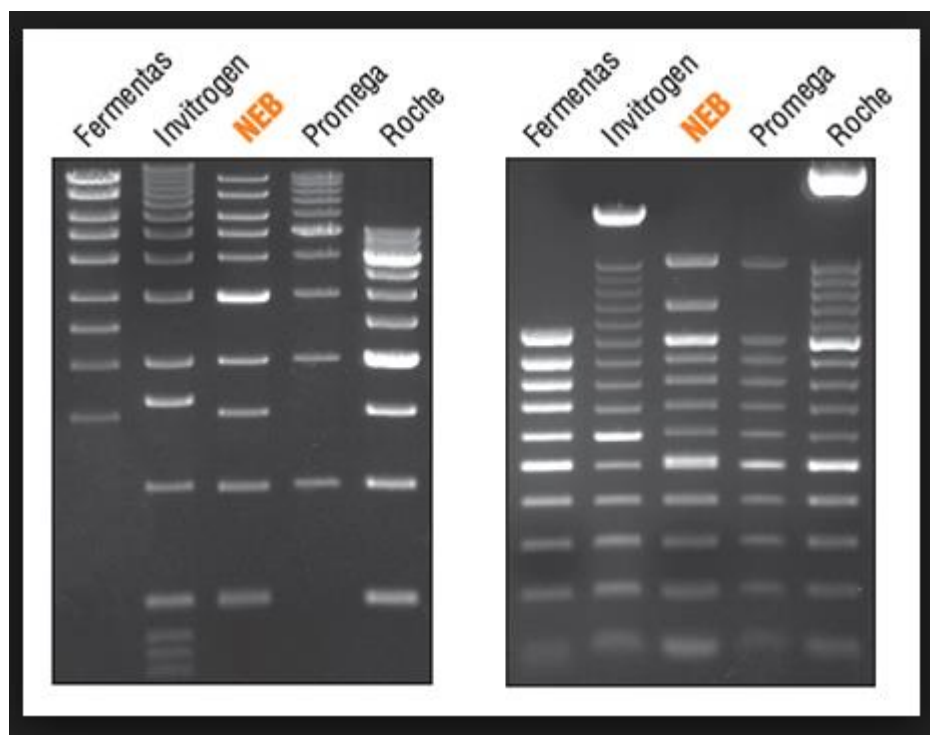


GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

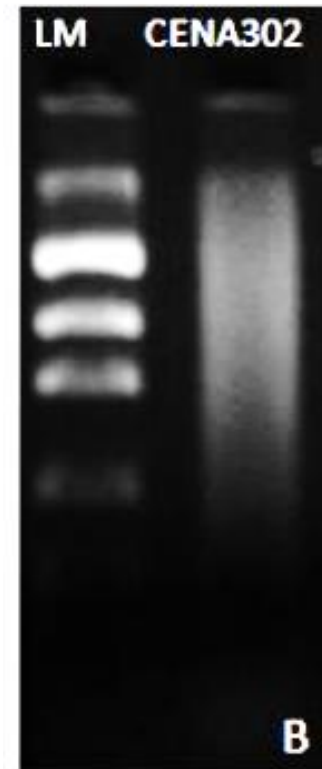
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder,
ready-to-use



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min



Perfil do DNA total tratado com enzima de restrição na eletroforese



RESUMINDO...

As enzimas de restrição permitem que regiões de interesse do DNA de organismos diferentes se unam formando um “DNA recombinante”

As enzimas de restrição do tipo II são as mais interessantes para a tecnologia do DNA recombinante

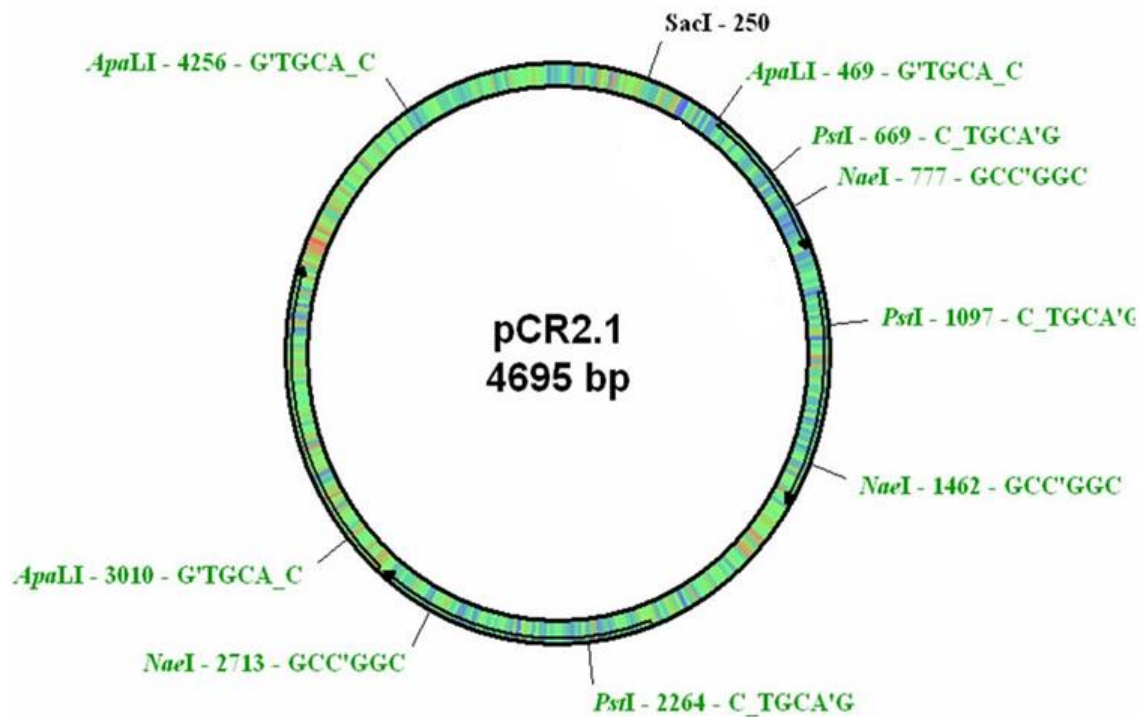
Reconhecem sequências palindrômicas e podem gerar extremidades “coesivas” ou “cegas”

Princípio da eletroforese: separação de moléculas de DNA de acordo com o tamanho do fragmento sob voltagem

ESTUDO DIRIGIDO

1. Tecnologia do DNA recombinante;
2. Variabilidade Genética e o Melhoramento Genético;
3. Definição de Enzimas de Restrição;
4. Tipos de extremidades que são geradas por enzimas de restrição;
5. Aplicações das Enzimas de Restrição;
6. Vetores e Plasmídios;
7. Características dos Vetores de clonagem;
8. Definição de Transformação Genética;
9. Tipos de transformação genética em Bactérias;
10. Tipos de transformação genética em Plantas.

Perfil do plasmídeo tratado com enzima de restrição na eletroforese



Enzimas de restrição: A e B

