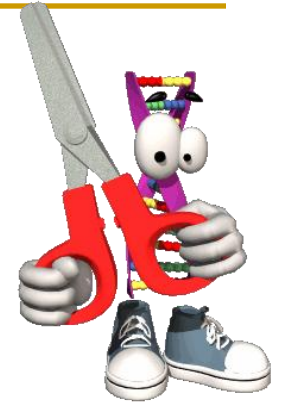
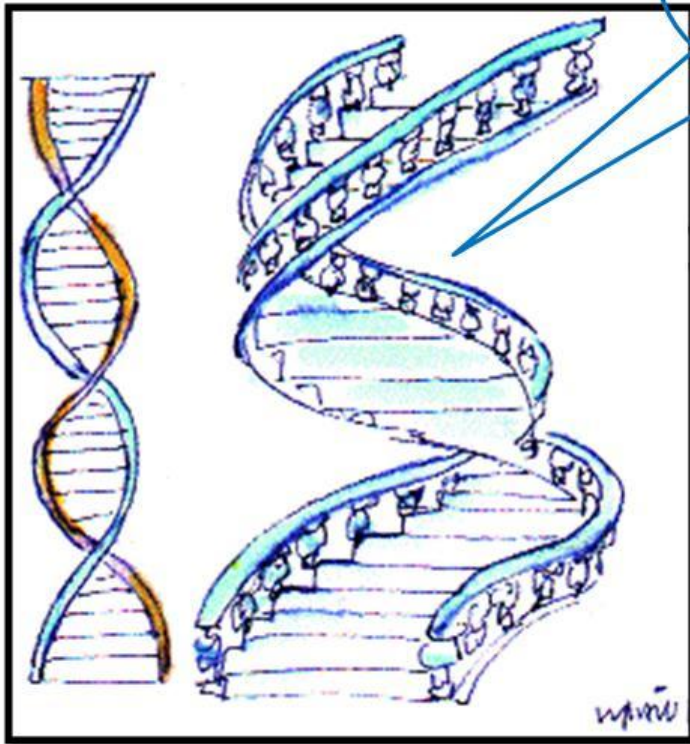


# Tecnologia do DNA Recombinante

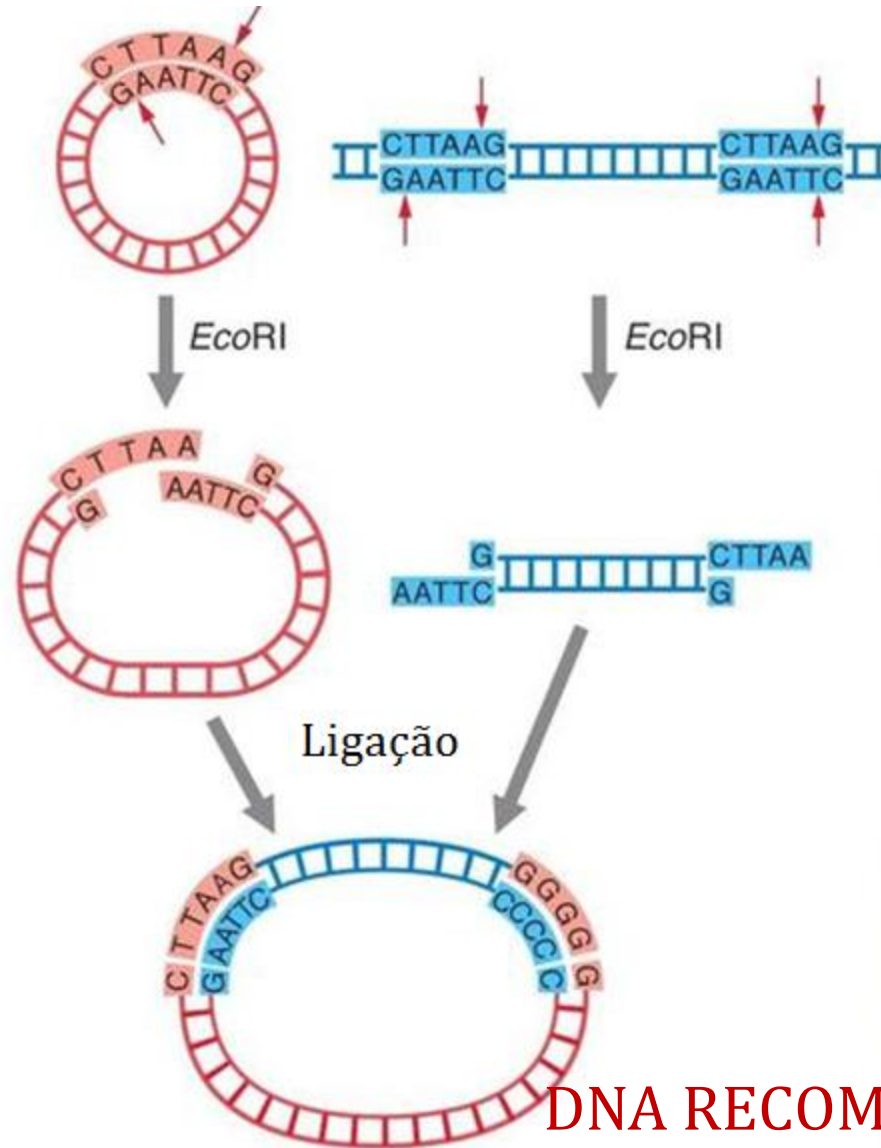


Você sabe  
com que  
DNA está  
falando?



# AULA PASSADA:

Enzimas de Restrição:

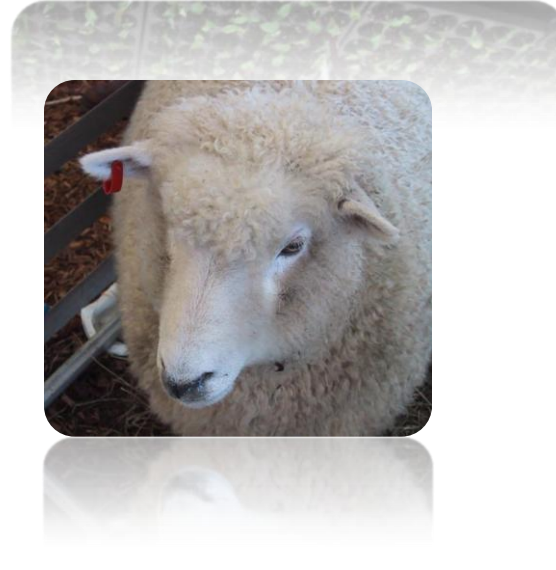


**DNA RECOMBINANTE!!!!**

*Clone: uma coleção de moléculas ou células, todas idênticas a uma molécula ou célula original.*

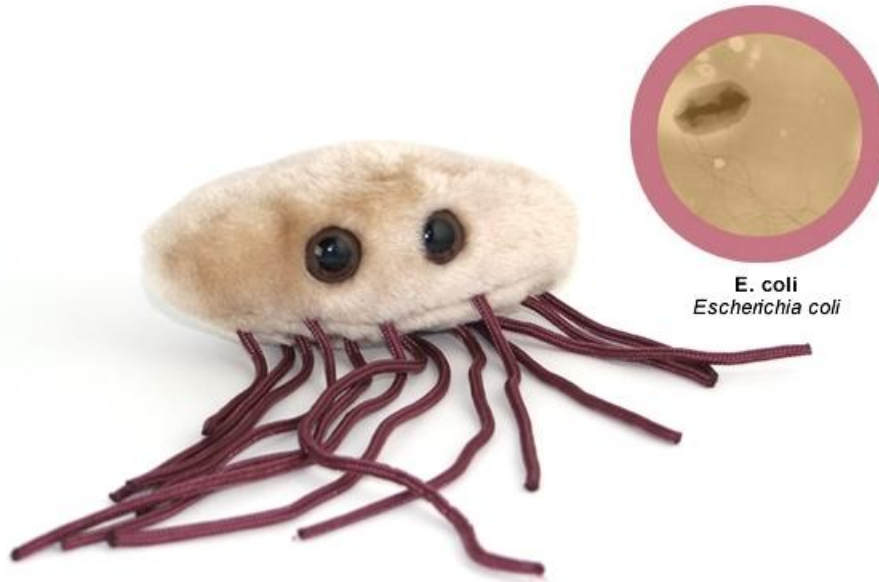


# Clonagem de indivíduos



# Clonagem Molecular

Clonagem dependente de células



Clonagem independente de células (PCR)



---

Vetores de clonagem - multiplicam moléculas de DNA recombinante em organismos vivos, gerando quantidades abundantes de clones

---



## *Escherichia coli*

- Unicelular, na forma de bastão;
- Cresce rapidamente a 37°C ;
  - ciclo de 20 min

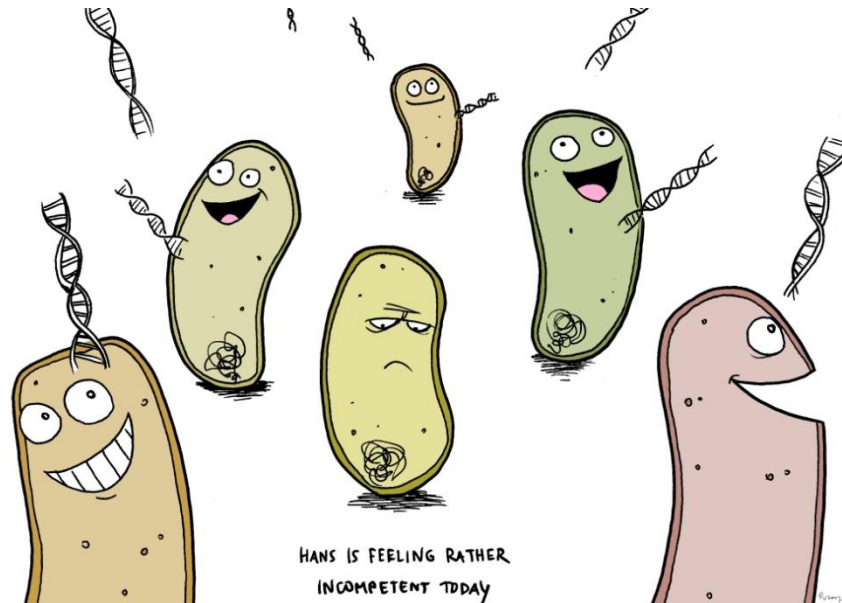
Uma geração: 20 minutos

- Pouco exigente quanto a nutrição;
- Meio mínimo ou rico:
  - Glicose - melhor fonte de C
  - Extrato de levedura - vitaminas
  - Triptona e Peptona: fonte aminoácidos



# INSERÇÃO DO DNA DENTRO DA CÉLULA BACTERIANA

- Não apresentam DNA plasmidial



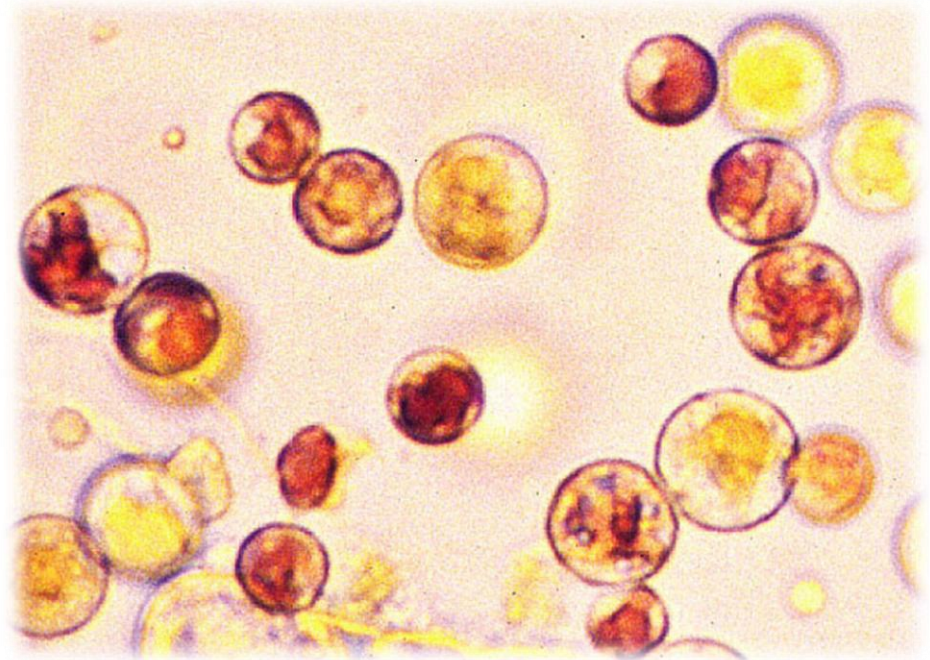


# BACTÉRIAS PARA TRANSFORMAÇÃO

- Transformação química
- Transformação por eletroporação

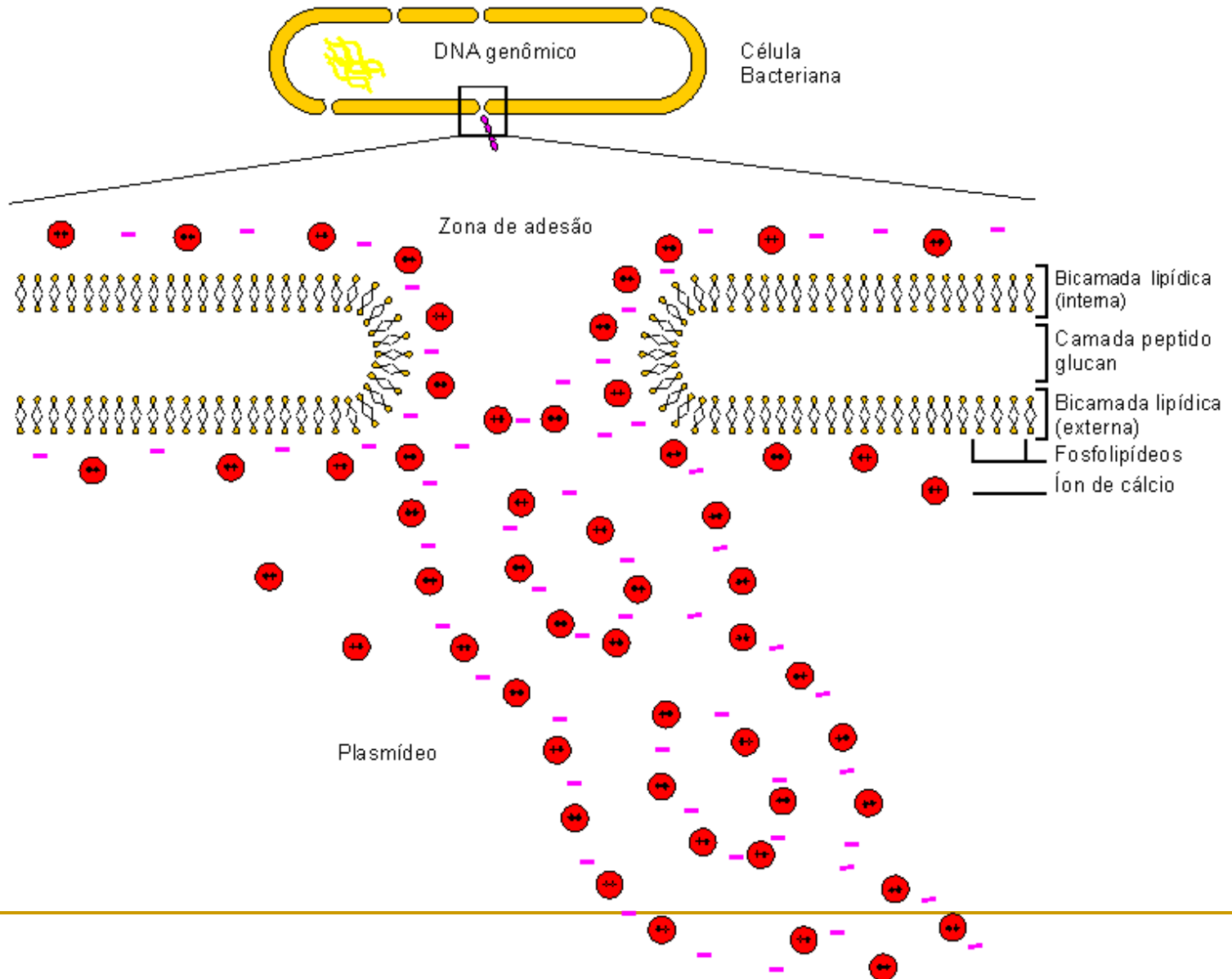


Eletroporador



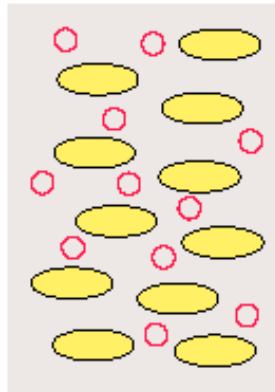
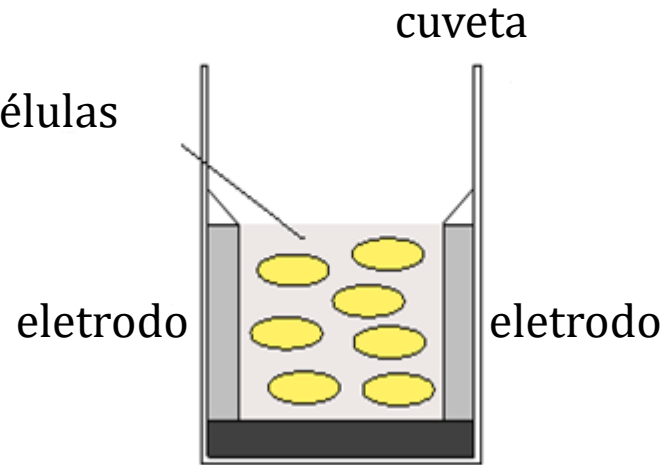
Células de *E.coli*

# TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA

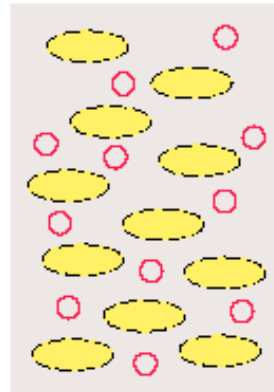


# ELETROPORAÇÃO

Suspensão de células



1

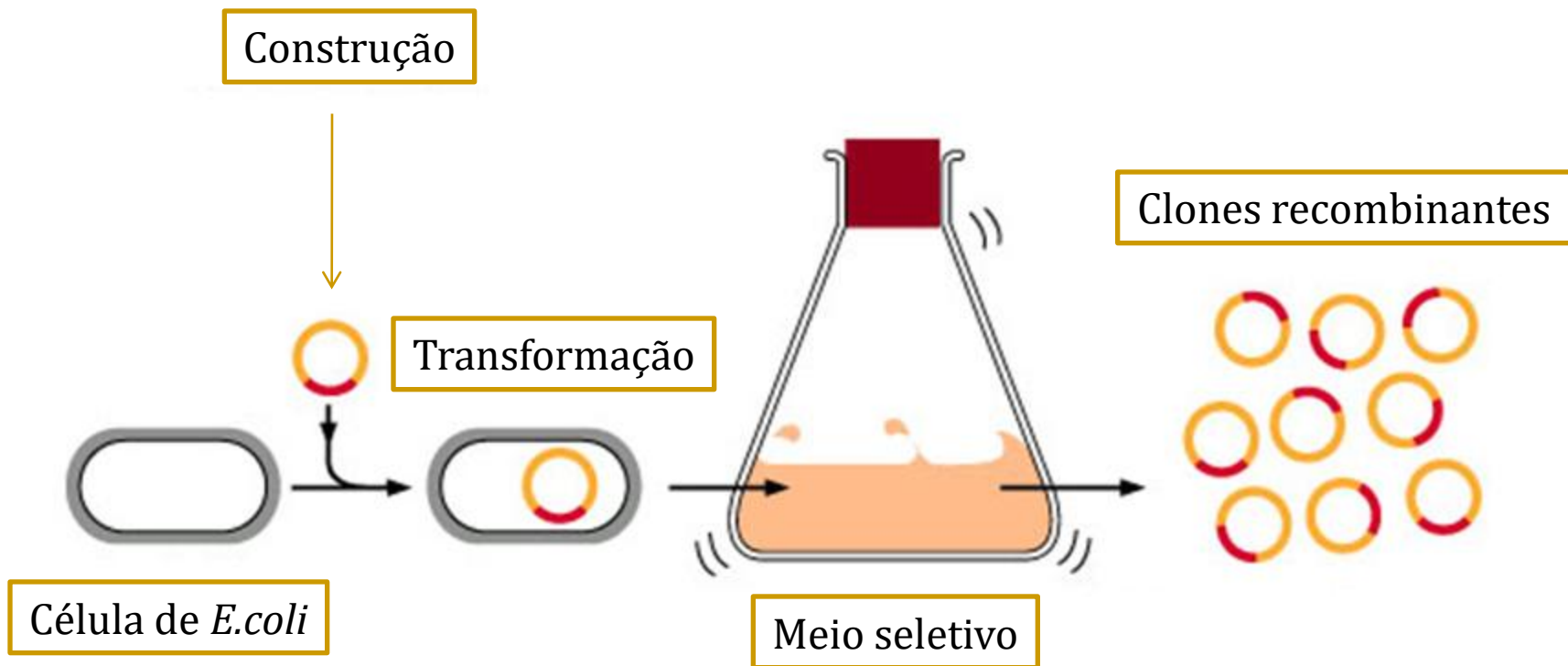


2

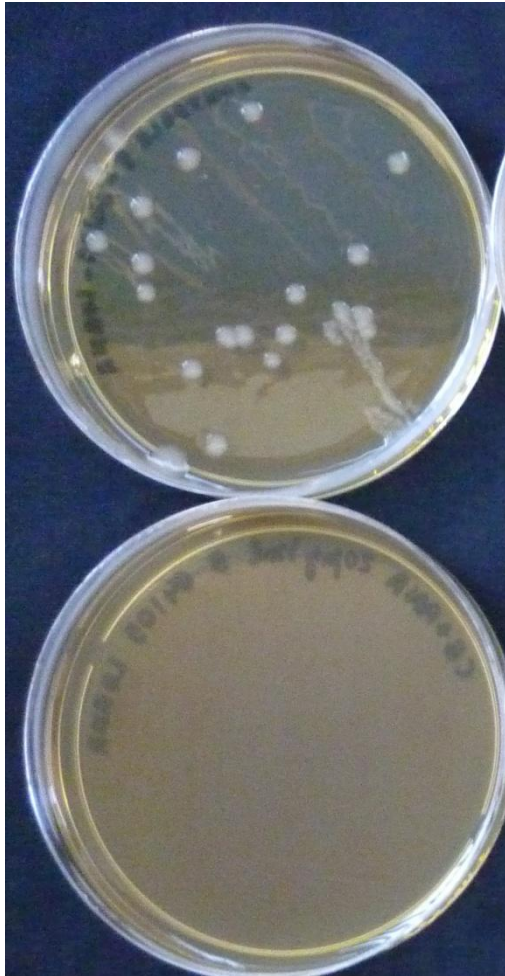


3

# SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES



MC + ampicilina



**Células transformadas**  
Clones resistentes a ampicilina

**Células controle (não transformadas)**  
Clones sensíveis a ampicilina

# Clonagem do DNA **sem** o envolvimento de células

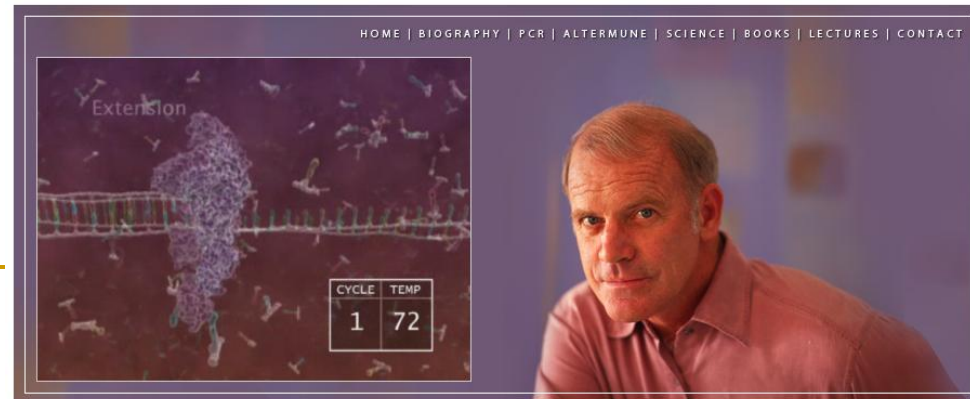


**PCR** – Reação em cadeia da DNA polimerase

*Polymerase Chain Reaction*

– Dr. Kary Banks Mullis

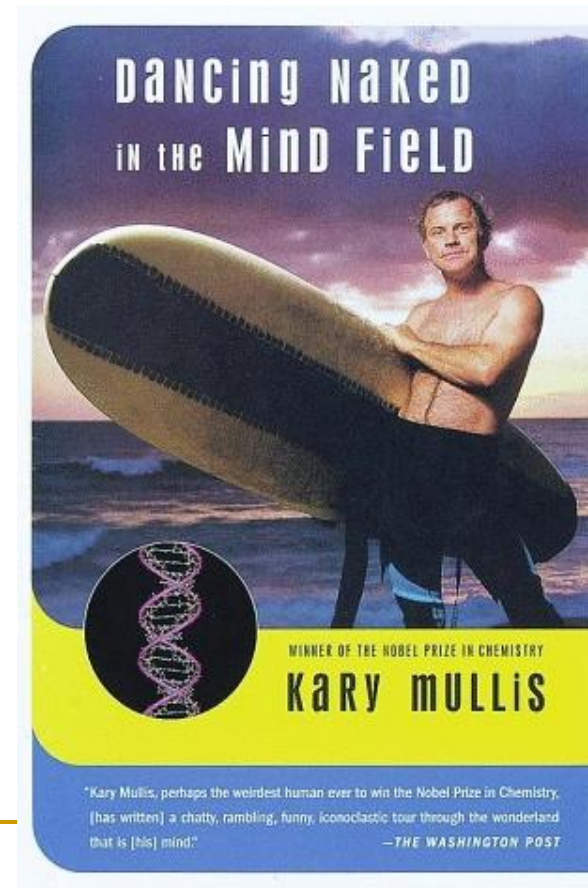
<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>



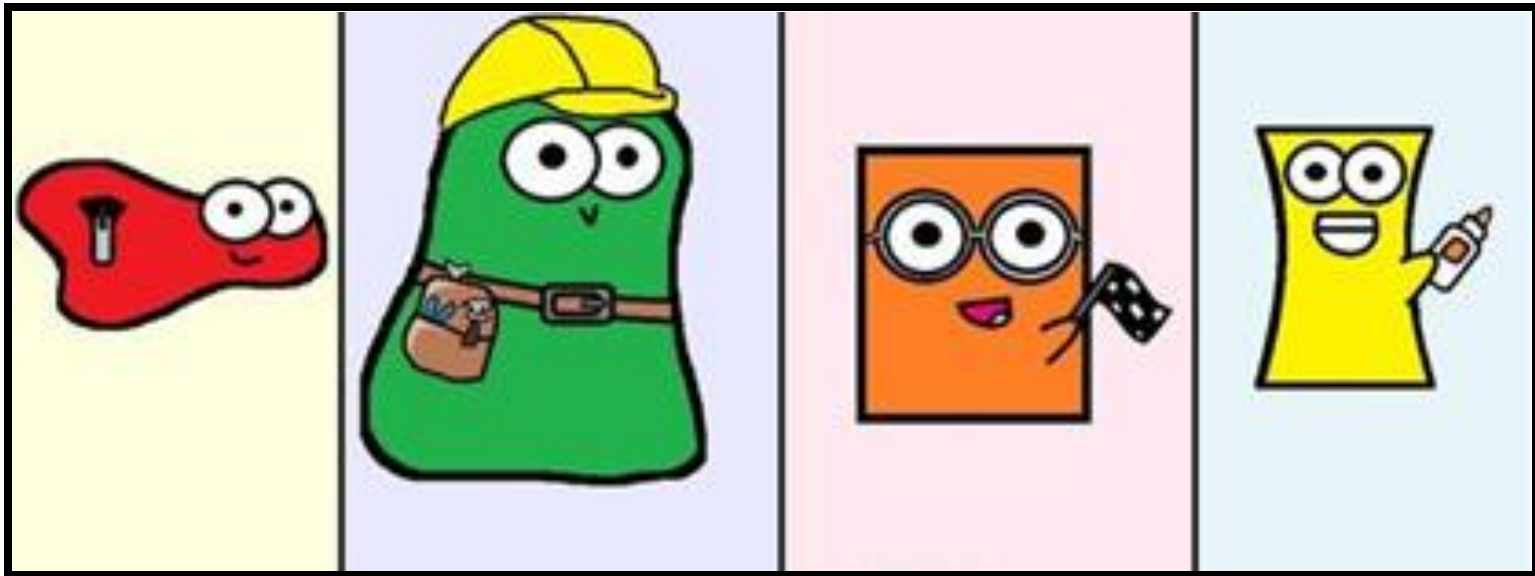
# PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)



- O processo de PCR foi **inventado** por Kary Mullis no início da década de 80 → atribuído o Premio Nobel de Química pelo seu trabalho.
- É um método de amplificação (síntese de várias cópias) de DNA **sem** o uso de um organismo vivo (*Escherichia coli* -bactéria- ou leveduras).
- Prêmio Nobel de Química em 1993.



# KEY PLAYERS DA REPLICAÇÃO DO DNA



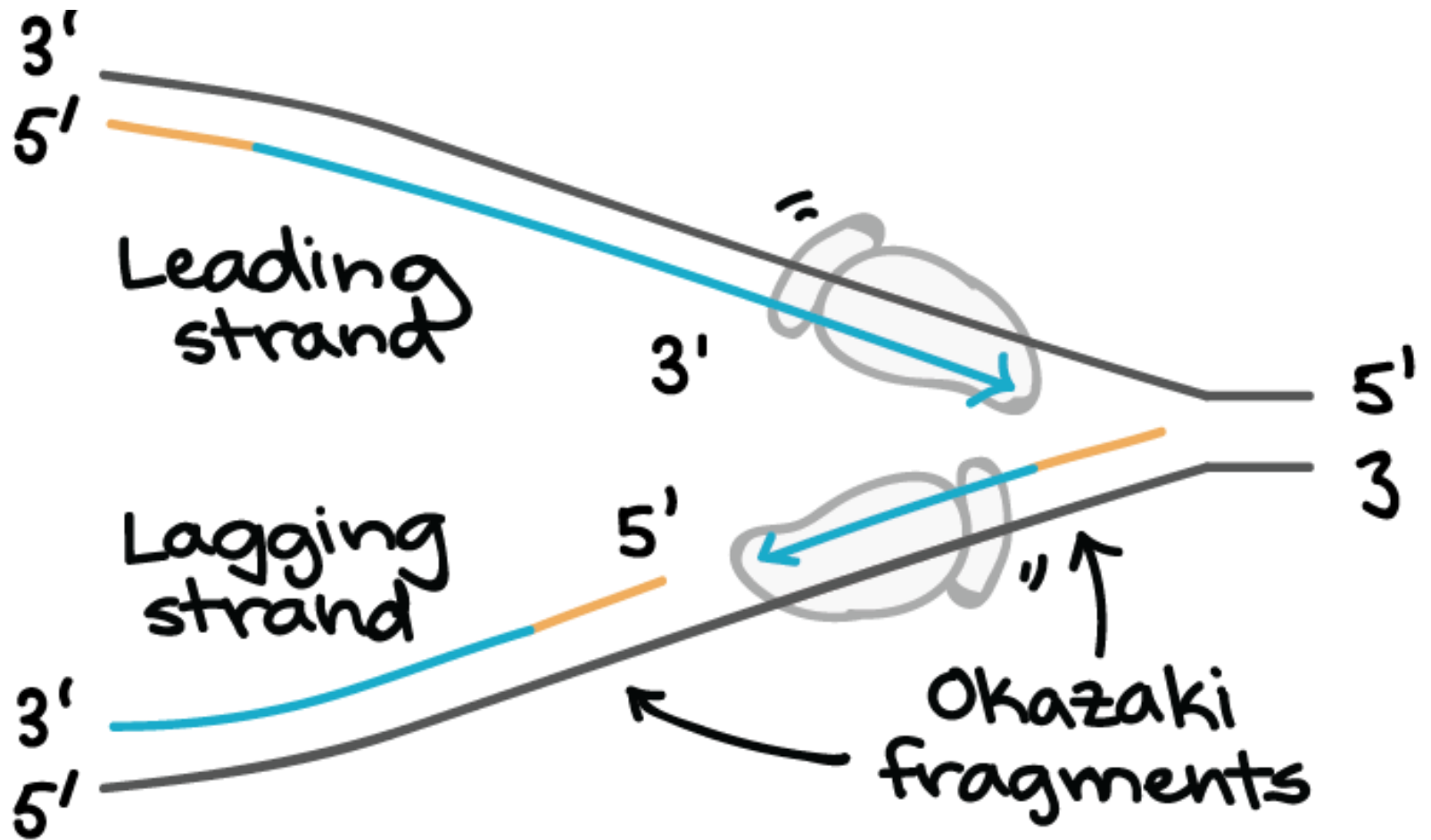
Helicase

DNA polimerase

Primase

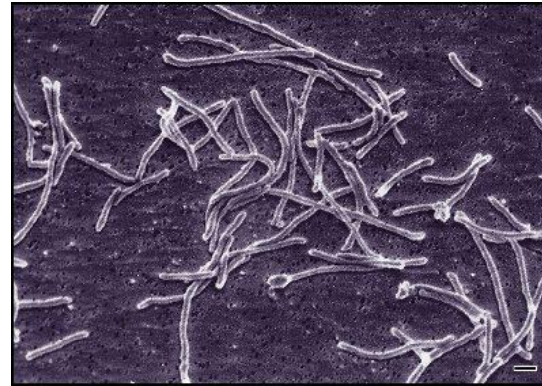
Ligase





# *Thermus aquaticus*

*Thermus aquaticus* é uma espécie de bactéria que pode suportar temperaturas elevadas, uma de várias bactérias termófilas. Esta é a fonte da enzima resistente ao calor como a Taq polimerase de DNA, um dos mais importantes enzimas na biologia molecular devido à sua utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica de amplificação de DNA.



A bactéria foi descoberta pela primeira vez no Lower Geysir Basin do Parque Nacional de Yellowstone

# {Hibridização, Hibridação, Anelamento} dos primers

**Target Sequence #1**

Primer sequence not complimentary = **No Recognition**

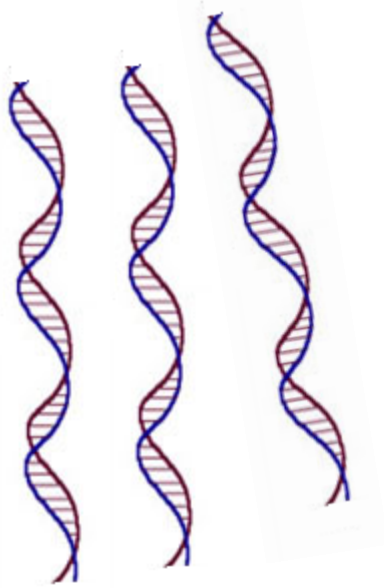


**Target Sequence #2**

Primer sequence complimentary = **Recognition**

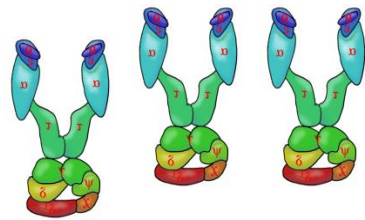
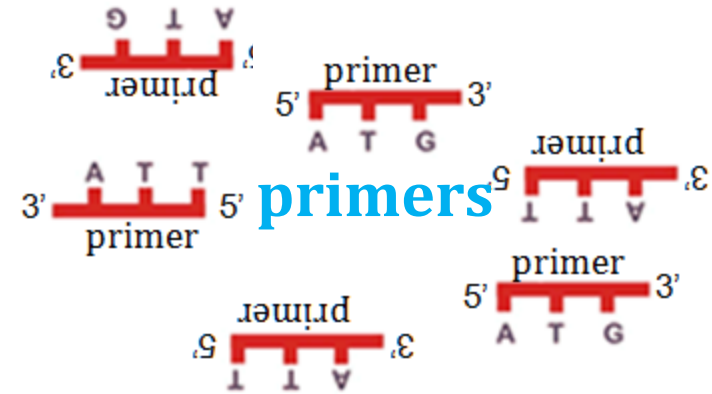


# REAÇÃO DE PCR

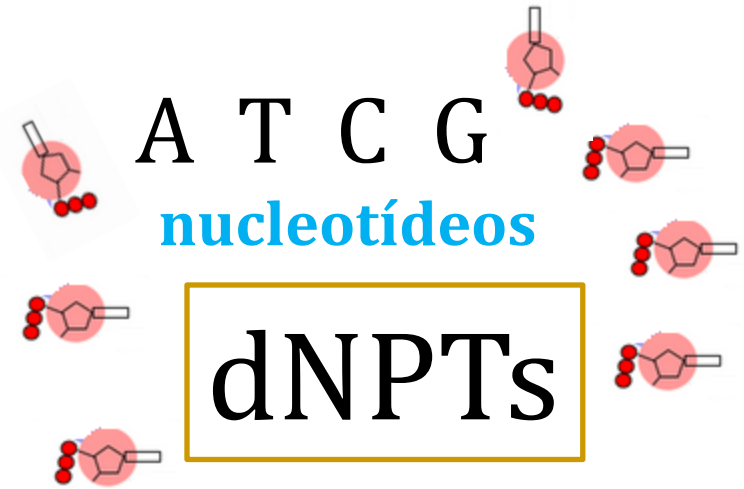
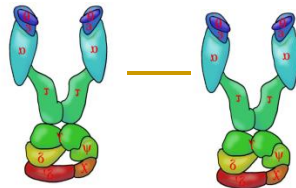


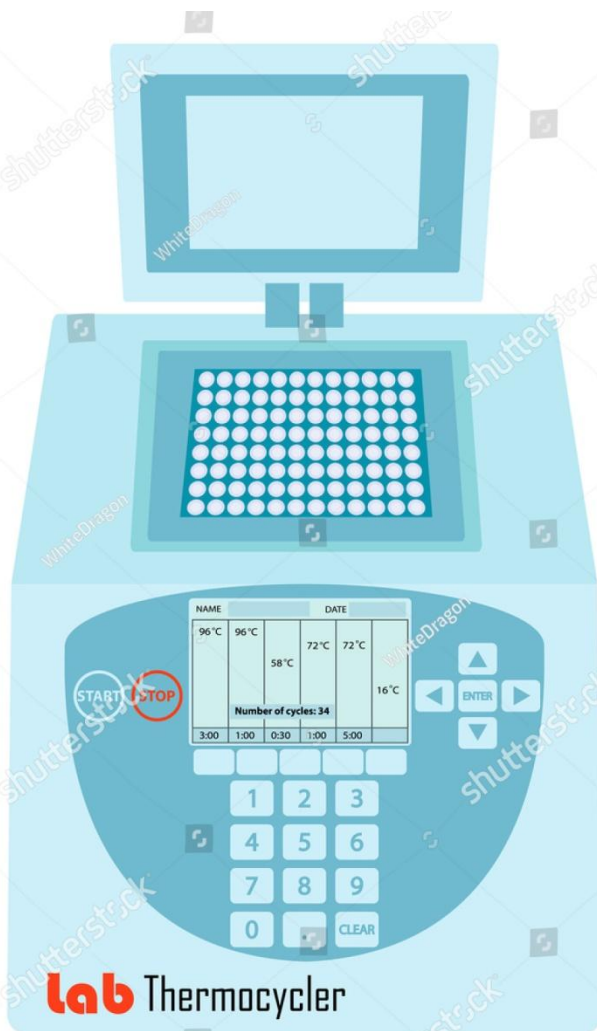
DNA molde

H<sub>2</sub>O + tampão

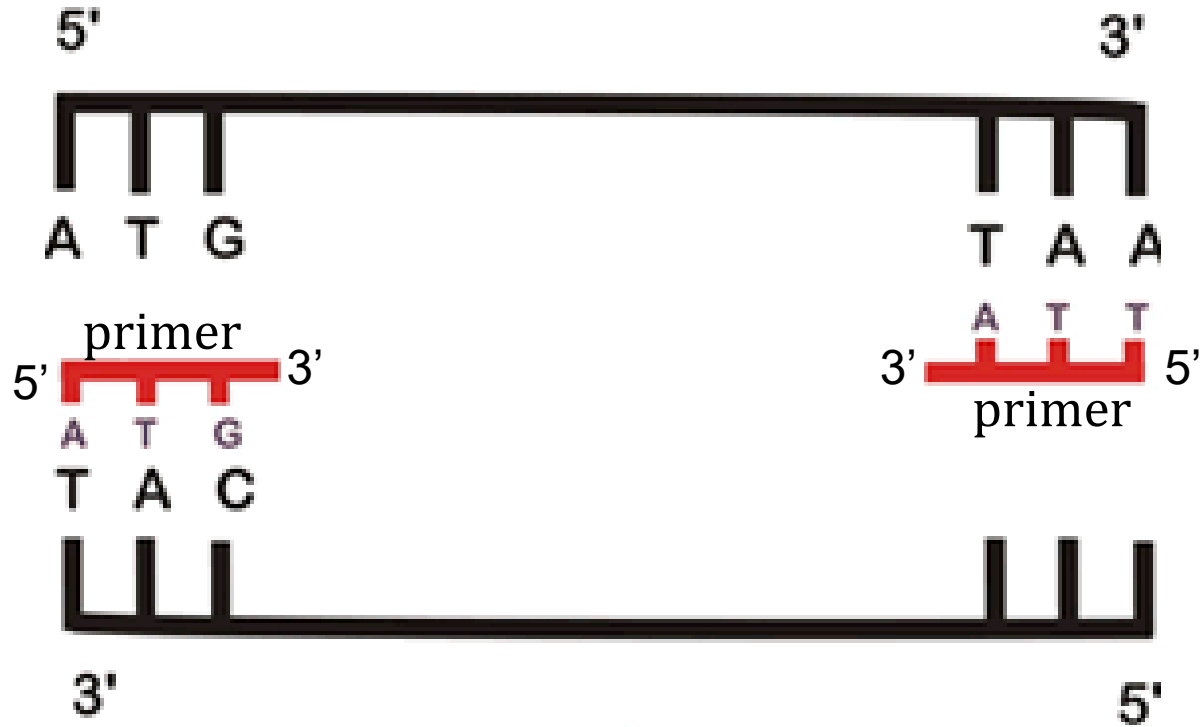


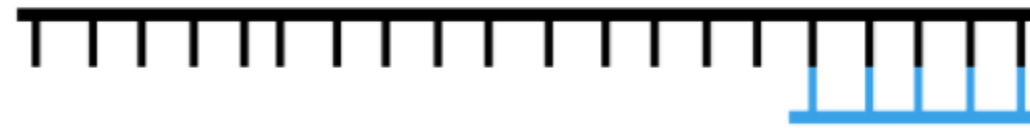
DNA polimerase





# DNA



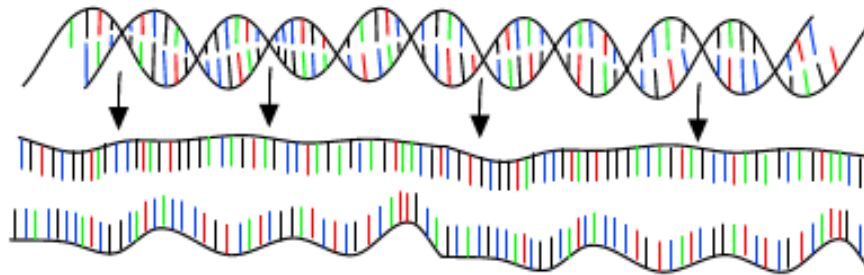


1) DNA é desnaturado

2) Primers anelam

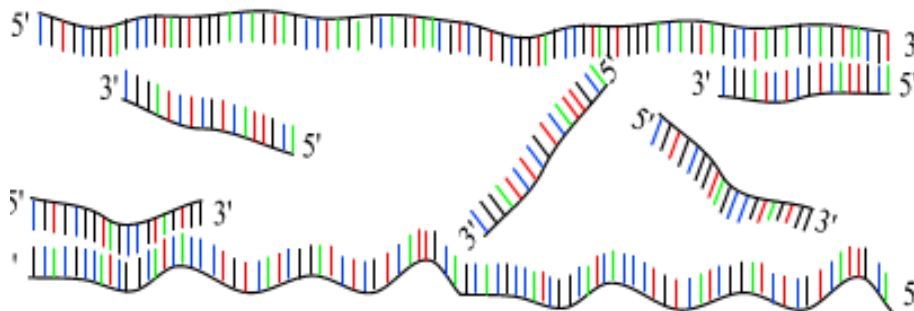
3) Polimerase sintetiza a  
cadeia complementar  
oposta

30 - 40 cycles of 3 steps:



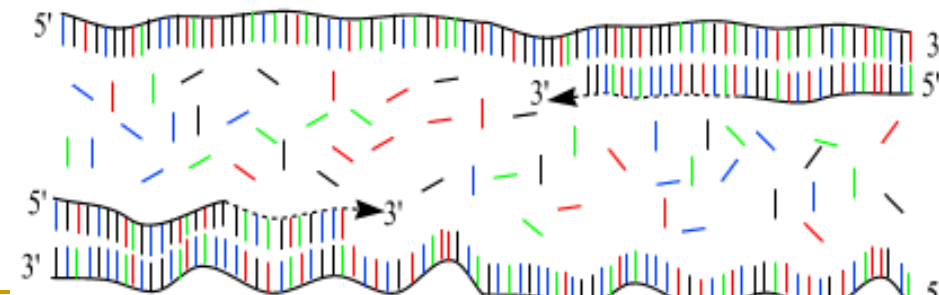
**Step 1 - desnaturação**

1 minuto - 94°C



**Step 2 - anelamento**

45 segundos - 55°C



**Step 3 - extensão**

45 segundos - 72°C



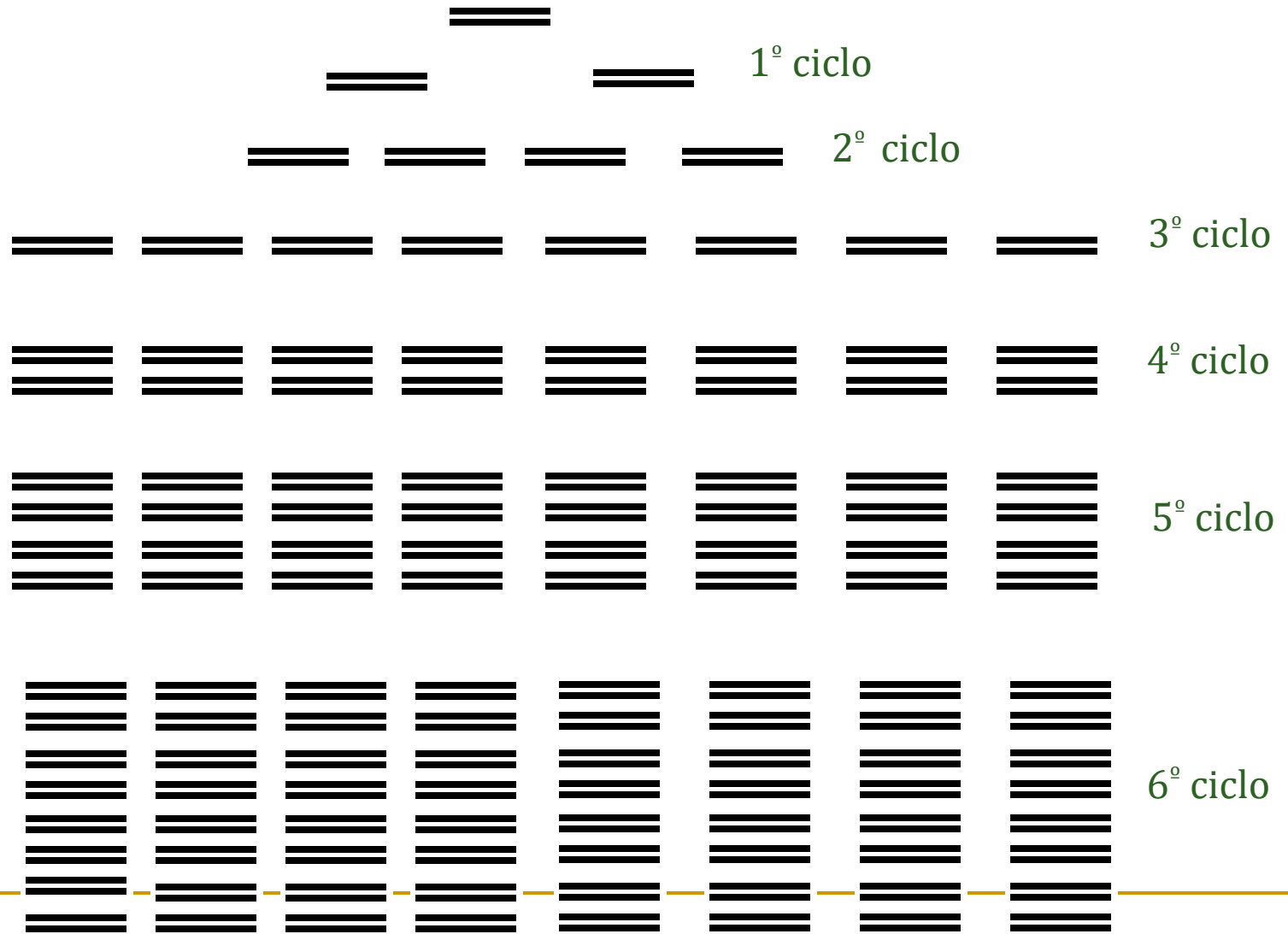
---

# PCR: *Polymerase Chain Reaction*

- **1. Desnaturação** (94-96°C, 30-60 segundos).
    - Durante a desnaturação, a cadeia dupla do DNA é separada em duas cadeias simples.
    - A DNA polimerase é estável a altas temperaturas pois é obtida de organismos que vivem em ambientes extremos (extremófilos). A DNA polimerase mais usada é a *Taq* polimerase (obtida de *Thermus aquaticus*).
  - **2. Annealing (emparelhamento, pareamento, hibridização)** (45-80°C, 30-120 segundos).
    - Durante o emparelhamento, os iniciadores (*primers*) ligam-se ao DNA de cadeia simples e a DNA polimerase liga-se aos iniciadores emparelhados.
  - **3. Alongamento (polimerização)** (65-80°C, 30-120 segundos).
    - Durante o alongamento, a DNA polimerase cria a cadeia de DNA complementar à medida que percorre o DNA de cadeia simples, incorporando desoxirribonucleotídeos presentes na reação.
    - Após cada ciclo, a quantidade de DNA duplica. Assim, após múltiplos ciclos, o aumento da quantidade de DNA é exponencial.
-



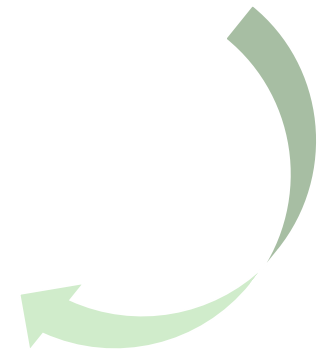
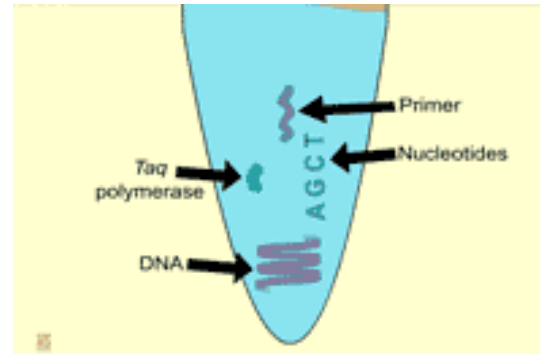
# PCR amplifica DNA

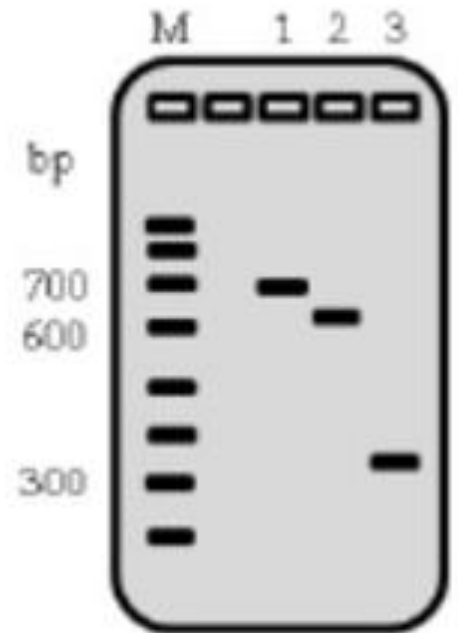
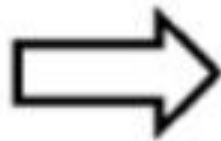
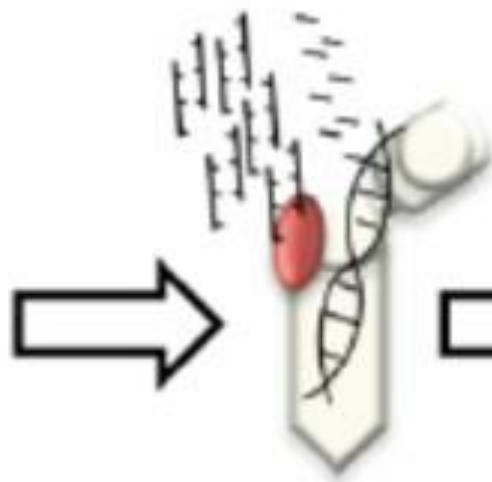


# Que reagentes são necessários para uma reação de PCR?

## REAGENTES:

1. DNA Molde
2. DNA polimerase;
3. *Primers*
4. dNTP's
5. *Buffers* (Solução-Tampão)
6.  $MgCl_2$







# ANIMAÇÕES

<https://www.youtube.com/watch?v=rn40R5w5Fkw>

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

---

---

<http://www.youtube.com/watch?v=oCRJ4r0RDC4&feature=related>

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/pcr.html>

<http://www.thehealthnews.org/news/06/08/02/pcr.html>

<http://croptechnology.unl.edu/whatsNew.cgi>

<http://www.youtube.com/DNALearningCenter#p/f/15/JRAA4C2OPwg>

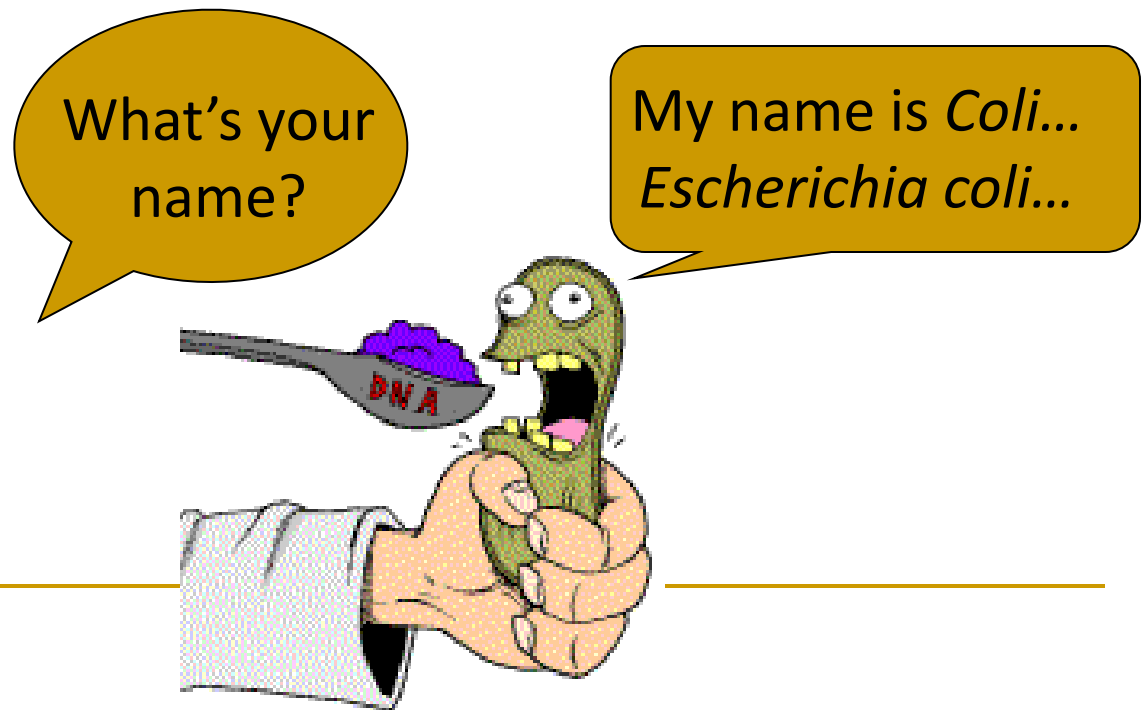
<http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120078/micro15.swf>

[http://pathology2.jhu.edu/molec/techniques\\_main.cfm##](http://pathology2.jhu.edu/molec/techniques_main.cfm##)

---

## ESTUDO DIRIGIDO

1. O que é tecnologia do DNA recombinante?
2. Quais as aplicações práticas da tecnologia do DNA recombinante?
3. O que é um vetor de clonagem?
4. Quais as características de um vetor de clonagem?
5. Qual a diferença entre plasmídeo e vetor de clonagem?
6. O que é transformação bacteriana? Qual o princípio? Quais as aplicações?
7. Como se faz a seleção de uma bactéria transformada?







---

# ANIMAÇÕES

<http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/pages/bcs-main.asp?v=category&s=00010&n=09000&i=09010.05&o=|00510|00610|00520|00530|00540|00560|00570|00590|00600|00700|00710|00010|00020|00030|00040|00050|01000|02000|03000|04000|05000|06000|07000|08000|09000|10000|11000|12000|13000|14000|15000|16000|17000|18000|19000|20000|21000|22000|23000|99000|&ns=456>

<http://juang.bst.ntu.edu.tw/BCbasics/Animation.htm>

---



# ANIMAÇÕES

<http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/pages/bcs-main.asp?v=category&s=00010&n=09000&i=09010.05&o=|00510|00610|00520|00530|00540|00560|00570|00590|00600|00700|00710|00010|00020|00030|00040|00050|01000|02000|03000|04000|05000|06000|07000|08000|09000|10000|11000|12000|13000|14000|15000|16000|17000|18000|19000|20000|21000|22000|23000|99000|&ns=456>

<http://juang.bst.ntu.edu.tw/BCbasics/Animation.htm>

---