

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E REPLICAÇÃO DO DNA

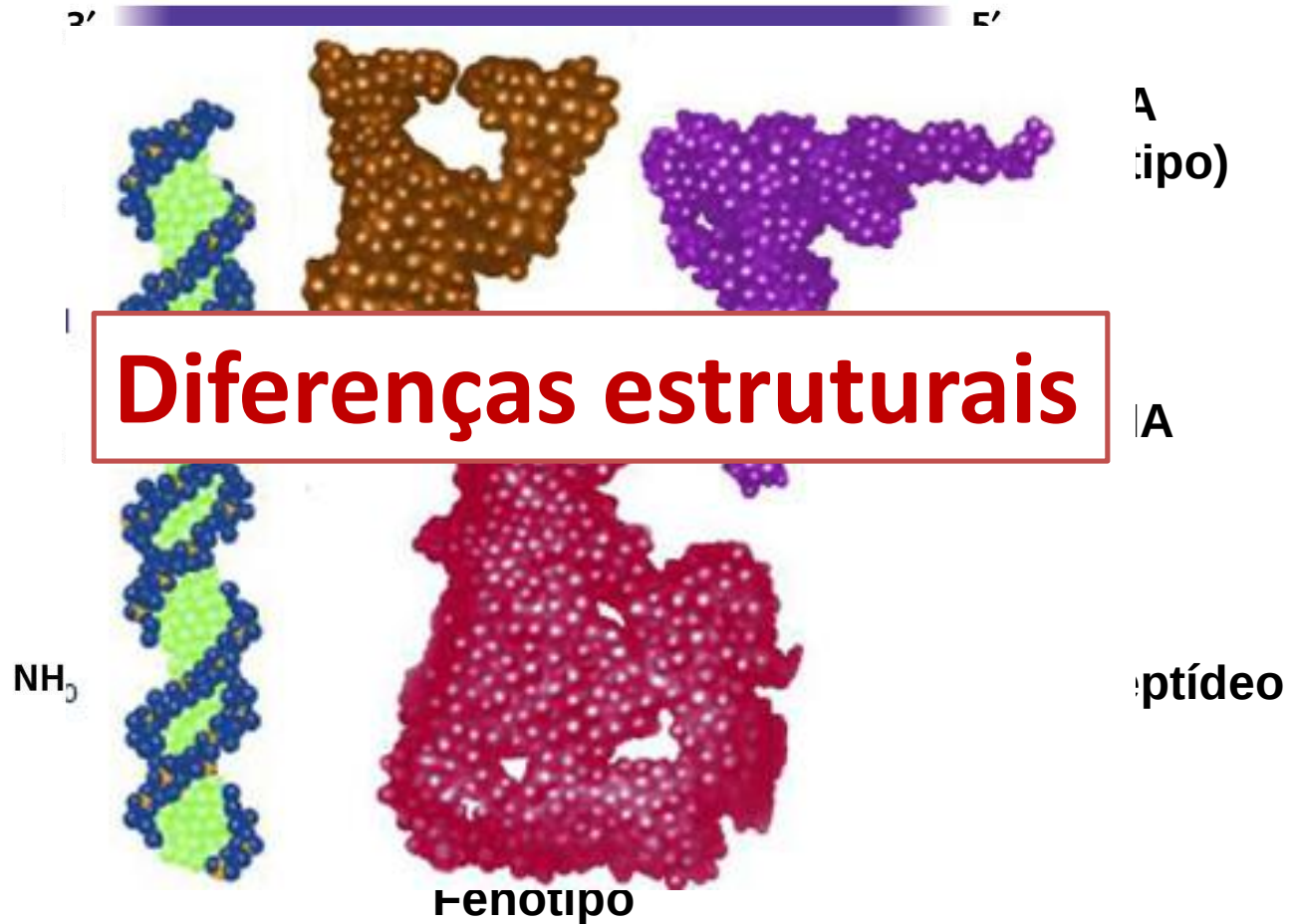
Aula 6

LGN0117 – Biologia Celular



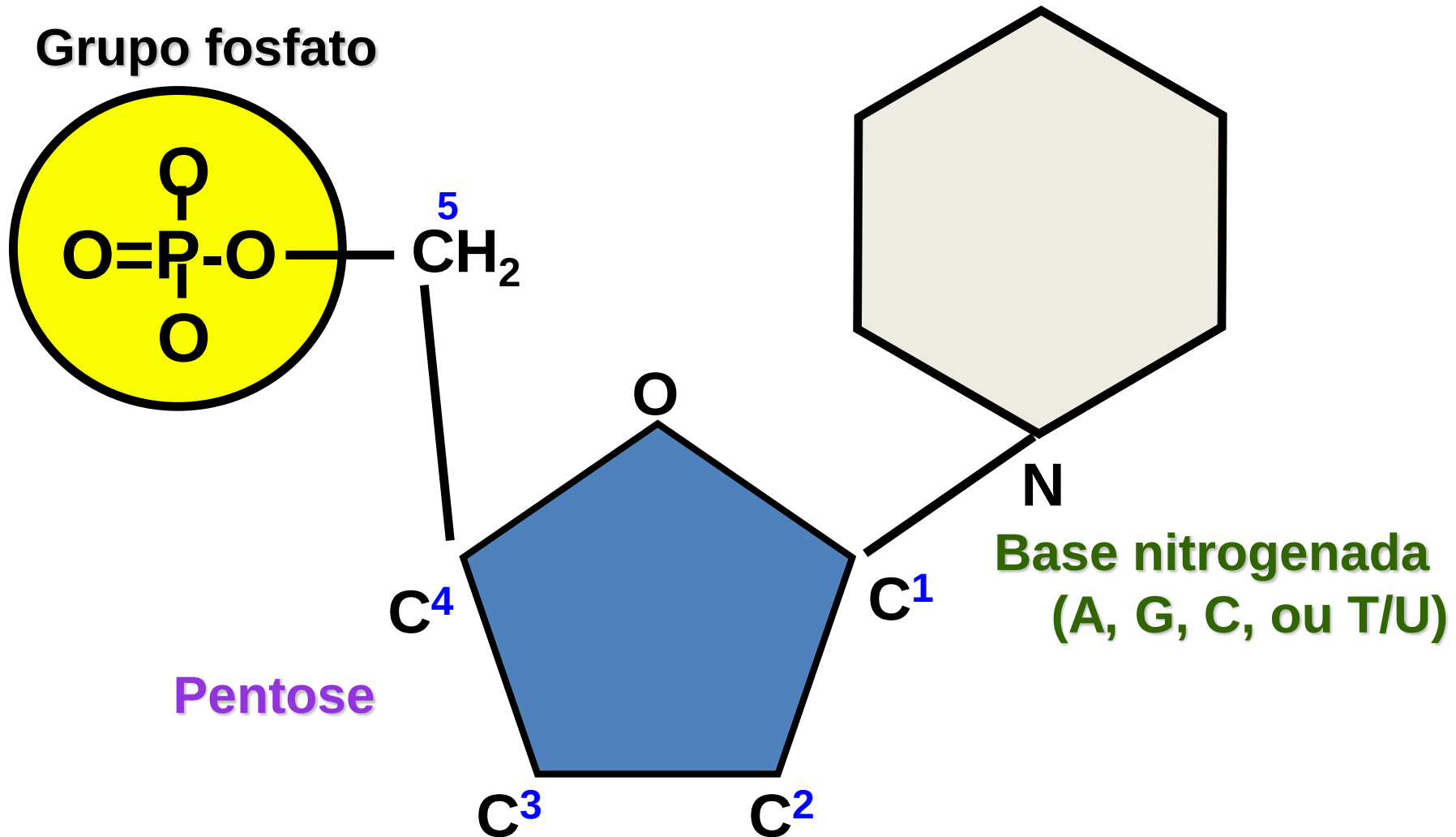
Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

DOGMA DA BIOLOGIA CELULAR



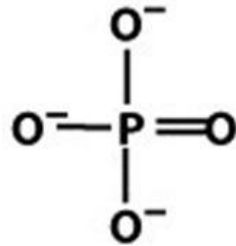
ÁCIDOS NUCLEICOS: DNA e RNA

Polímeros de **nucleotídeos**



COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

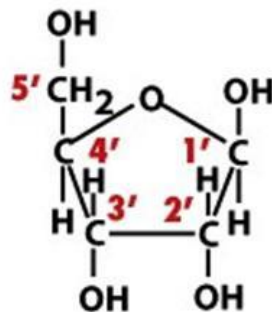
(1)
Um
grupamento
fosfato:



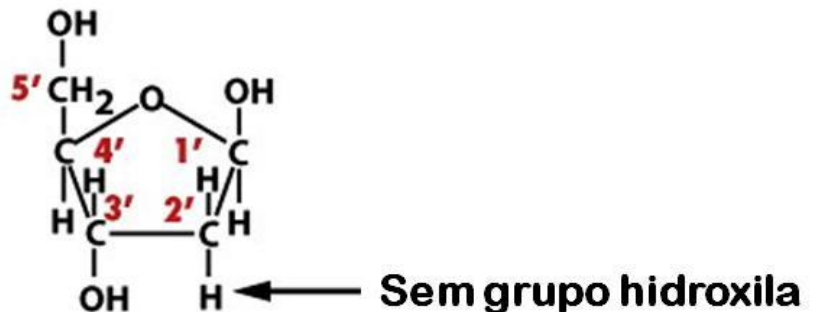
Carbono 5

(2)
pentoses
(açúcares
de 5
carbonos)

(a) RNA:
Ribose



(b) DNA:
2-Desoxirribose

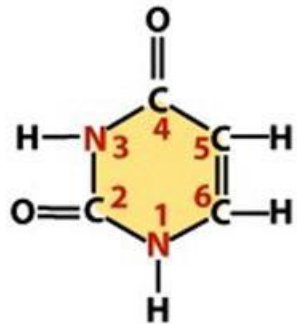


Carbono 2

COMPONENTES DOS NUCLEOTÍDEOS

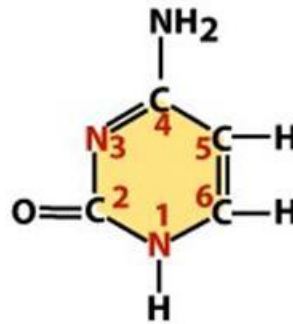
(3)
Uma base
cíclica
contendo
Nitrogênio

(a) RNA



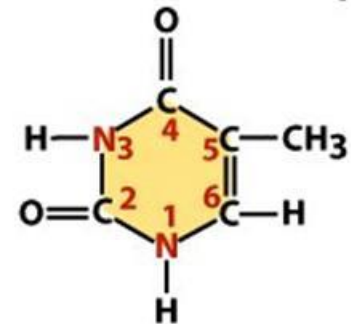
Uracila

(b) DNA e RNA

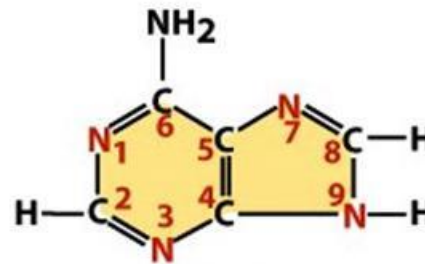


Citosina

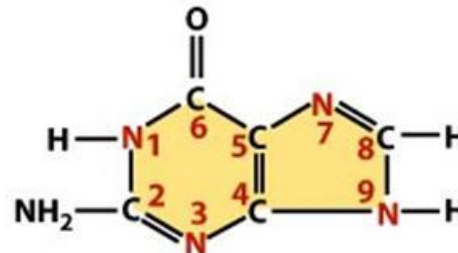
(c) DNA



Timina



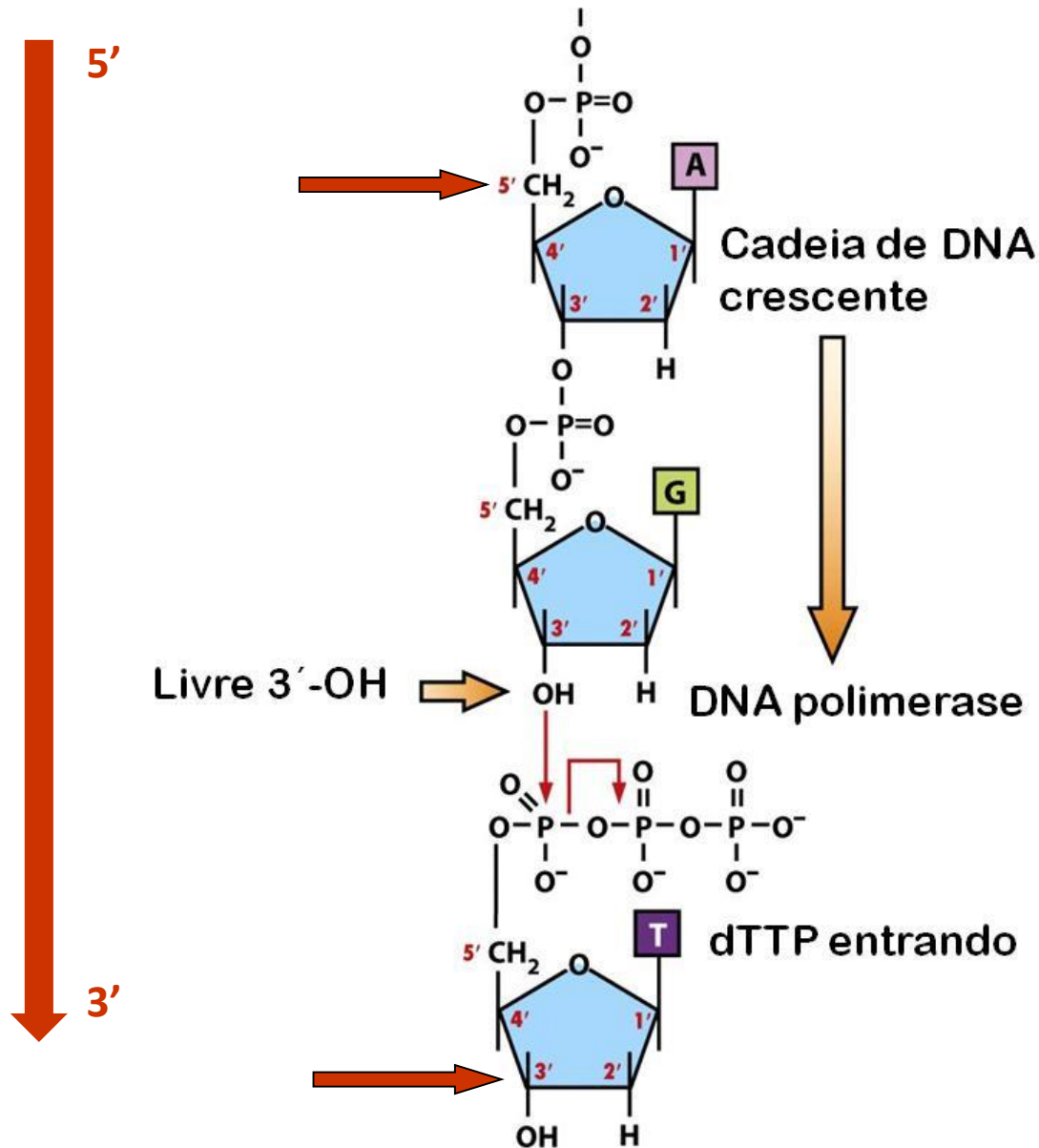
Adenina



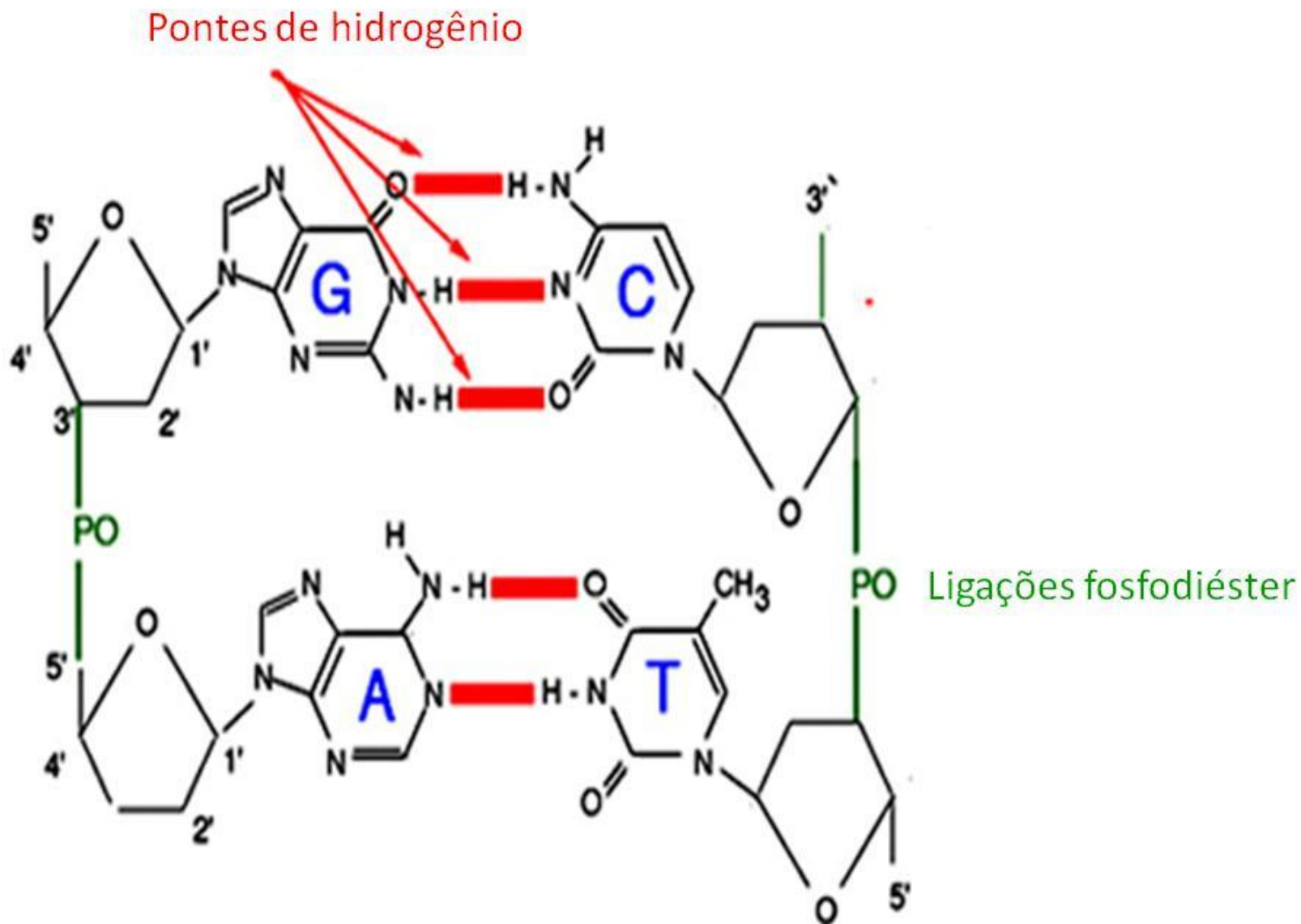
Guanina

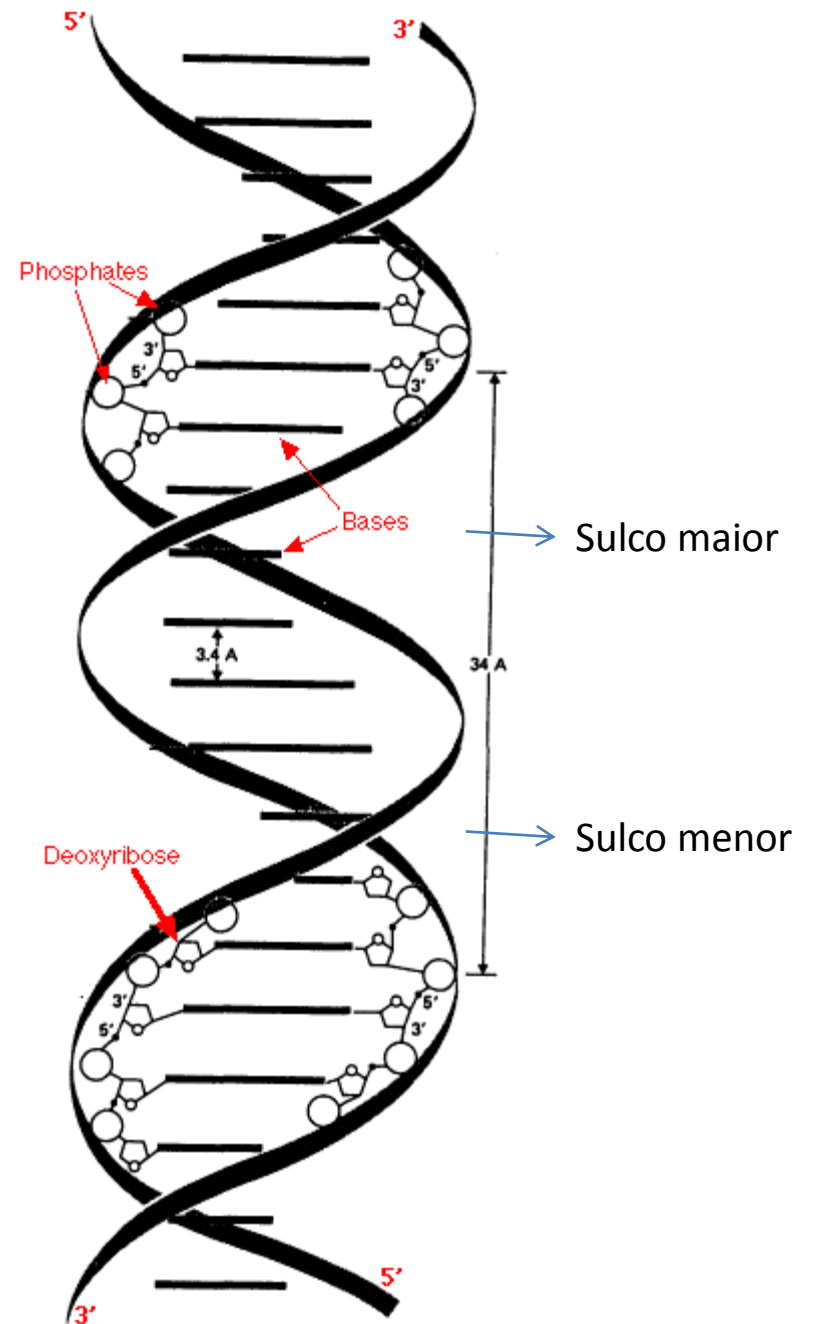
Purinas: A, G
Pirimidinas: U, T, C

LIGAÇÕES FOSFODIÉSTER

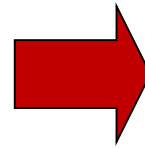


ESTRUTURA DO DNA

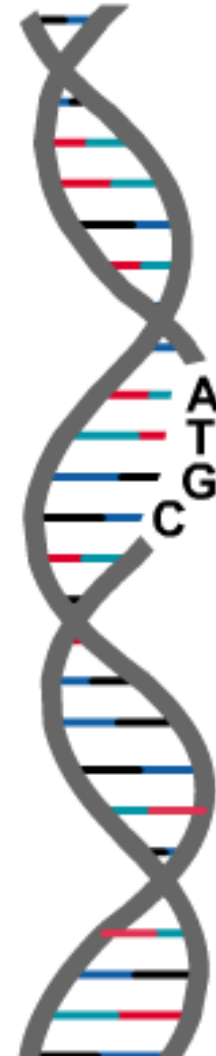




EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS



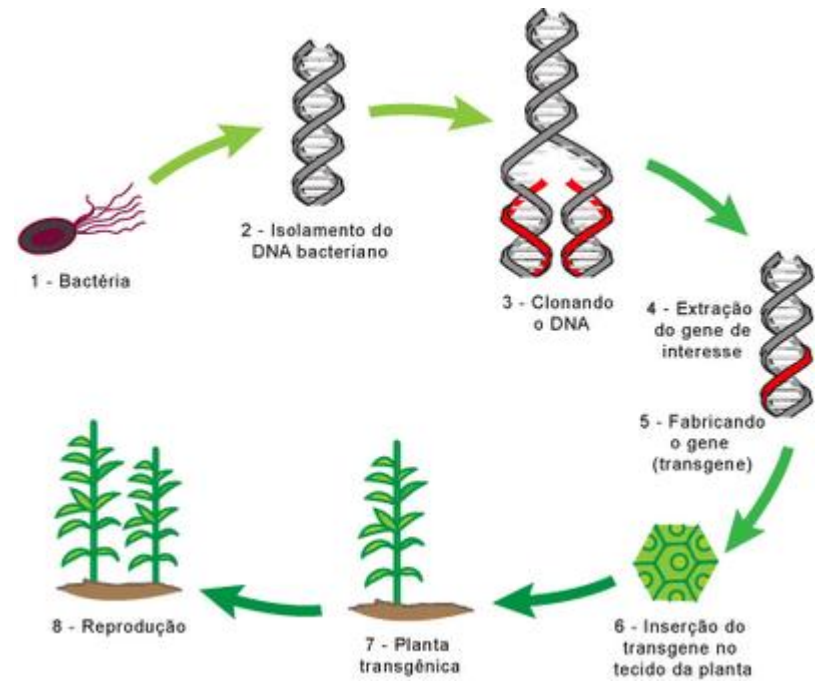
Rompimento da
célula



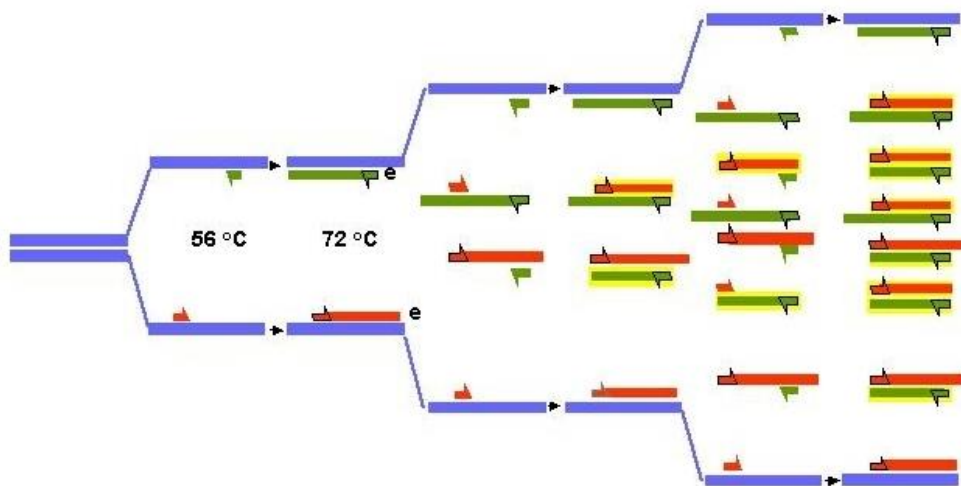
✓ A Biologia Molecular e a Engenharia Genética baseiam-se em técnicas de extração, análise e manipulação de ácidos nucleicos.

✓ Por meio de sequências de DNA podemos estudar todos os tipos de organismos (alguns vírus, bactérias, plantas e animais).

Estudos evolutivos



Obtenção de OGMs



Diagnose de doenças



**INICIALMENTE PRECISAMOS DO DNA
EXTRAÍDO!**

EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS

- ✓ Toda extração de DNA se baseia em 4 etapas básicas, presentes em qualquer protocolo de extração:
- 1. Lise das membranas lipídicas;
- 2. Purificação do DNA;
- 3. Precipitação do DNA;
- 4. Reidratação do DNA.





Folhas (350 mg)

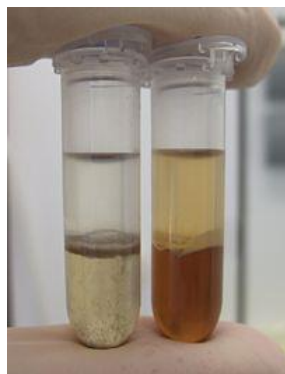
Cortar e transferir para o almofariz (cadinho)



Macerar com N₂ líquido



Adicionar 1,0 mL de tampão de extração



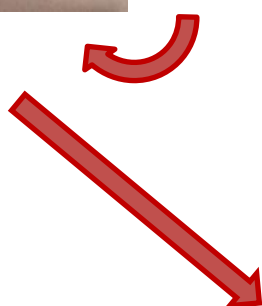
Centrifugar 12000 rpm



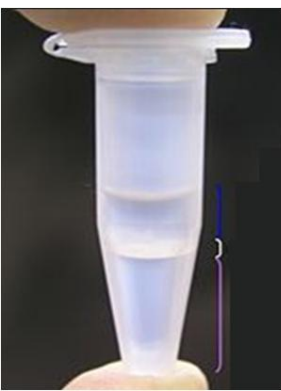
Adicionar 0,5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico



Incubar os tubos em banho-maria (70°C) por 20 min.



Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar isopropanol



Fase aquosa: DNA
Interfase: proteínas
Fase orgânica: lipídios



Agregados de moléculas de DNA precipitadas pelo isopropanol

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

Tris-HCl pH 8,0 => manter o pH da solução durante a extração e evitar a ação de nucleases que podem degradar o DNA (o pH ótimo para ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0);

EDTA (ácido etileno diamono tetracético) => substância quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e, portanto, inibe a ação de DNAses, que usam esses metais como cofatores;

CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) => detergente para romper as membranas celulares;

PVP (polivinilpirrolidona) => O DNA deve ser protegido da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente. Agentes anti-oxidantes: PVP, BSA (albumina de soro bovino) ou β -mercaptoetanol;

NaCl => sal, adicionado para auxiliar na precipitar o DNA.

Clorofórmio => desnatura as proteínas e as tornam insolúveis na fase aquosa, onde encontram-se os ácidos nucleicos;

Isopropanol => precipita o DNA na presença de íons como Na^{+} ;

N_2 líquido (-192 °C) => rompe a parede celular durante o processo de maceração do tecido em almofariz com pistilo.

Como extrair o DNA de qualquer coisa (por exemplo: lentilhas, morangos, etc)

<http://g1.globo.com/platb/espiral/2008/08/29/a-primeira-descoberta-do-dna/>



1. Manda ver e bata tudo no liquidificador:
1/2 xícara de lentilhas
1/8 de colher de chá de sal
1 copo de água gelada



2. Use um coador para eliminar os pedaços maiores.

Adicione 2 colheres de detergente (uns 30 mLs) e mexa com uma colher.

Deixe quieto por uns 5 minutos.

Transfira o "caldo" para um tubo de vidro, encha menos que a metade do tubo (um copo de coquetel fino e pequeno funciona).



+

+

3. Para digerir as proteínas, coloque um pouco de suco de abacaxi (uns 2 mL). Se não tiver, serve a solução limpadora de lentes de contato. Mexa com um canudo. Devagar para não quebrar o DNA!

4. Com o tubo inclinado, adicione o mesmo volume de álcool, vagarosamente, pela parede do tubo. O álcool é menos denso que a água e deve flutuar por cima do "caldo".

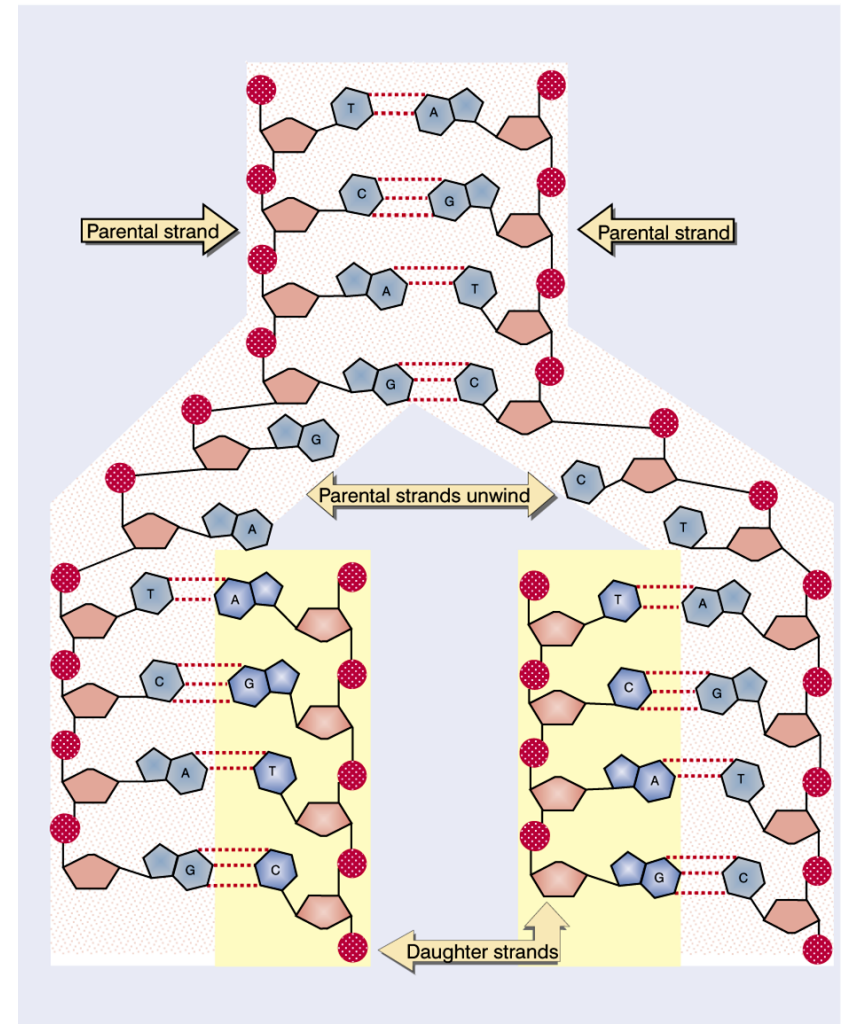


5. O DNA é uma molécula longa. O sal que você adicionou no primeiro passo auxilia as fitas a grudarem, umas nas outras, formando essa "coisa" branca e viscosa que você observa quando coloca o álcool. O DNA se dissolve em água, mas quando em contato com o sal e álcool precipita. Você consegue isolar o DNA enrolando esse precipitado num palito.

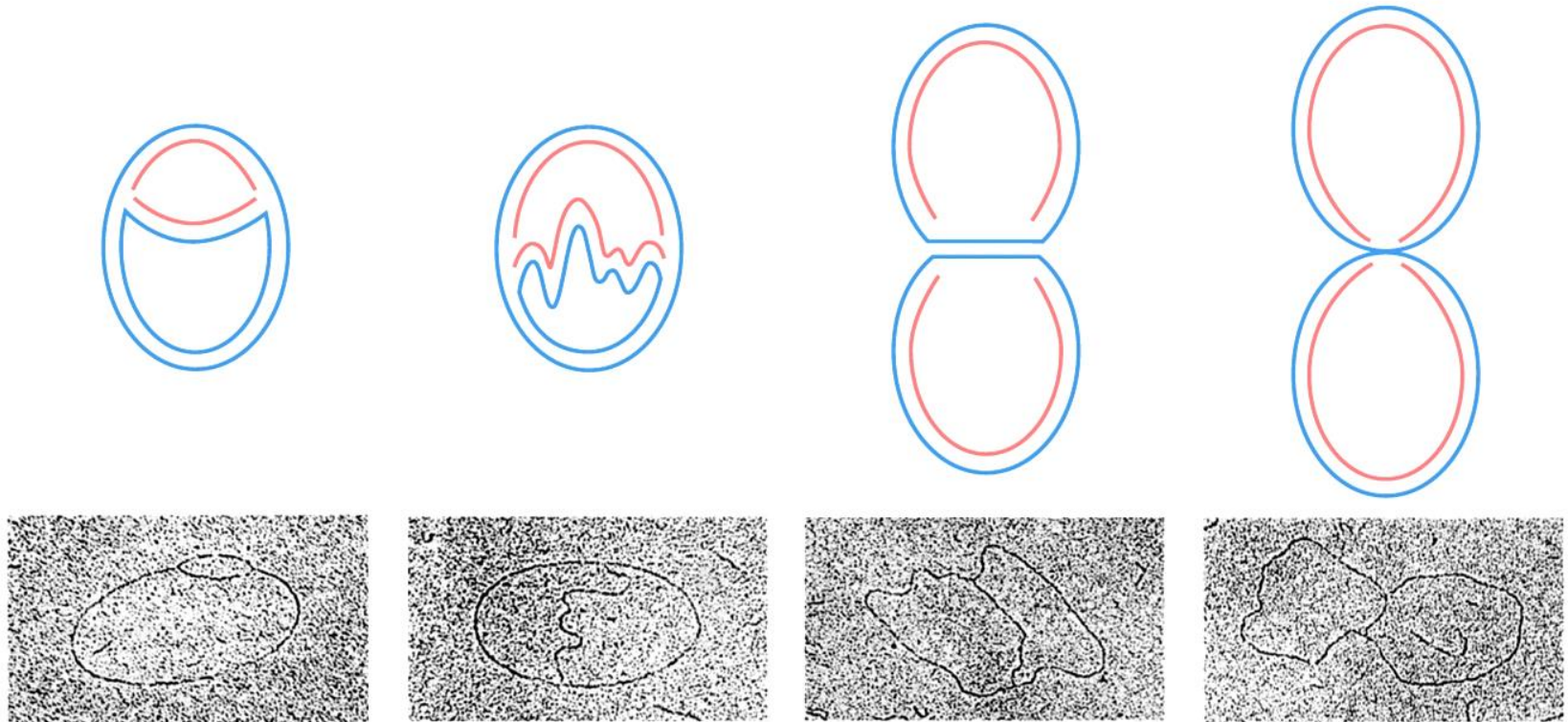


REPLICAÇÃO DO DNA

- ✓ O DNA replica-se por um mecanismo **semiconservativo**: a medida que os dois filamentos complementares de uma dupla hélice parental se desenrolam e se separam, cada um serve como um molde para a síntese de um novo filamento complementar;
- ✓ Os potenciais de ligações das bases dos filamentos moldes especificam as sequências de bases complementares nos filamentos de DNA nascentes;
- ✓ A replicação é iniciada em origens únicas e em geral continua bidirecionalmente a partir de cada origem.



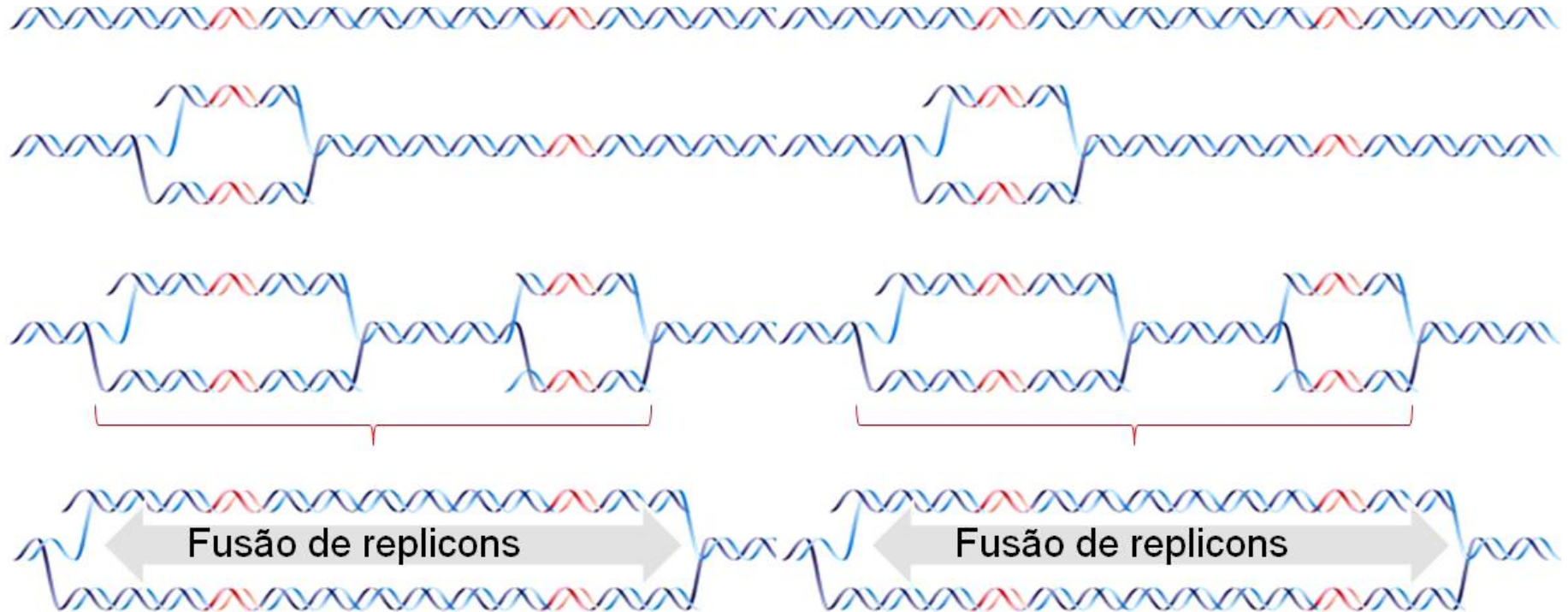
A REPLICAÇÃO DO CROMOSSOMO CIRCULAR



A replicação é bidirecional

- A velocidade da forquilha de replicação de procarioto é cerca de 30.000 pb/min
- 1 único replicon

A replicação do cromossomo linear de eucarioto



- A velocidade da forquilha de replicação de eucarioto é cerca de 3.000 pb/min;
- Os replicons de eucariotos têm cerca de 40-100 kb e são iniciados em tempos diferentes. (não sabemos todos os fatores que determinam qual origem e em que momento ela fica ativa - O *timing* da replicação pode, por ex. ser determinado pela atividade do gene: genes mais transcritos são replicados primeiro).

PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS

1. DNA Polimerases
2. Helicases
3. Topoisomerases (girases)
4. Primases
5. Telomerases

PONTOS IMPORTANTES SOBRE AS DNA POLIMERASES

- ✓ A síntese de DNA é catalisada por enzimas chamadas DNA-polimerases;
- ✓ Todas as DNA-polimerases precisam de um filamento primer, que é ampliado, e um filamento molde que é copiado;
- ✓ Todas as DNA-polimerases tem necessidade absoluta de uma 3'-OH livre do filamento primer, e toda a síntese de DNA ocorre no sentido 5' → 3';
- ✓ As atividades de exonuclease 3' → 5' das DNA-polimerases revisam filamentos nascentes à medida que eles são sintetizados, removendo quaisquer nucleotídeos malpareados nas pontas 3' dos filamentos primer.

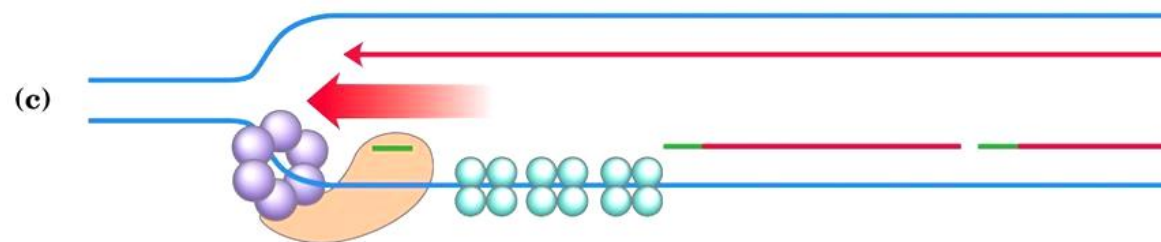
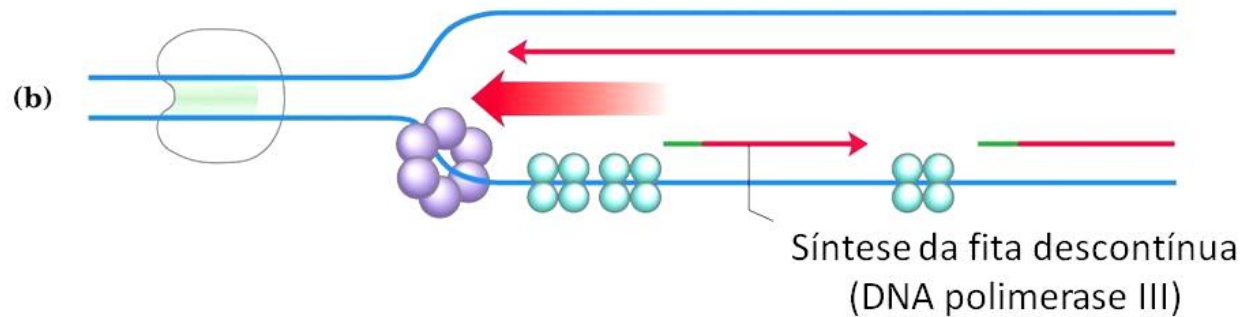
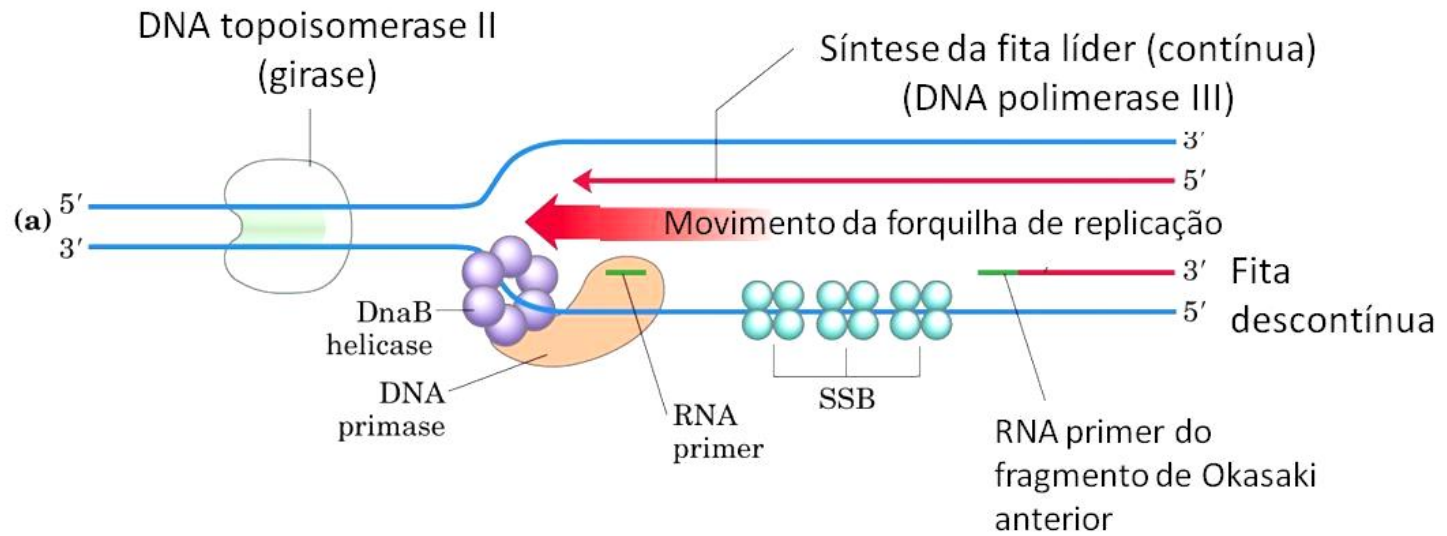
PROTEÍNAS PRESENTES NA ORIGEM DE REPLICAÇÃO

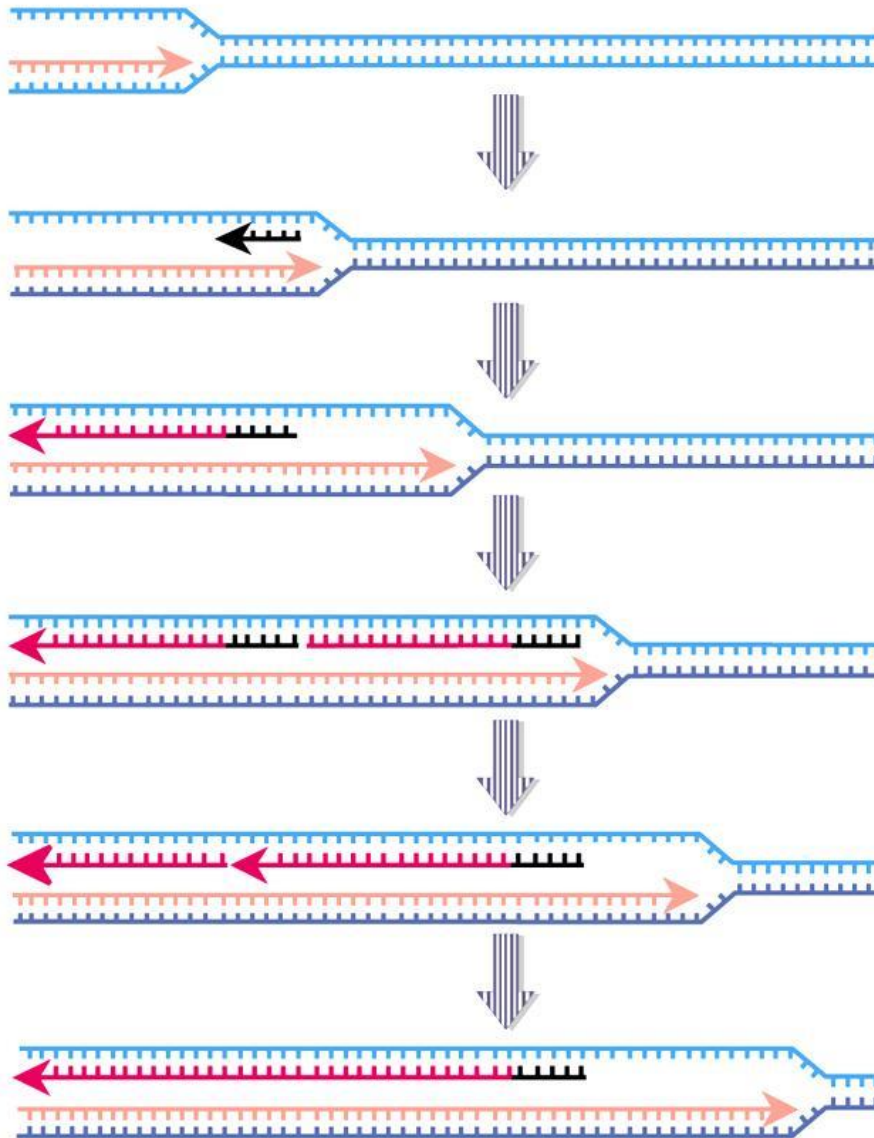
Helicase	Desenrola o DNA
DNA girase (topoisomerase)	Alivia a tensão de torção gerada pela abertura da dupla-fita
Primase	Sintetiza os primers de RNA
DNA polimerases	Polimerização do DNA, retirada dos primers e reparo do DNA
Single strand binding (SSB)	Liga a fita simples de DNA
DNA ligase	Une os fragmentos de Okasaki

REPLICAÇÃO DO DNA

- Se a replicação é semi-conservativa e a polimerização deve ser sempre no sentido $5' \rightarrow 3'$
- Mas o DNA é antiparalelo ou seja, uma fita ocorre no sentido $5' \rightarrow 3'$ e a outra no sentido $3' \rightarrow 5'$
- Como ocorre então a replicação nos dois sentidos?







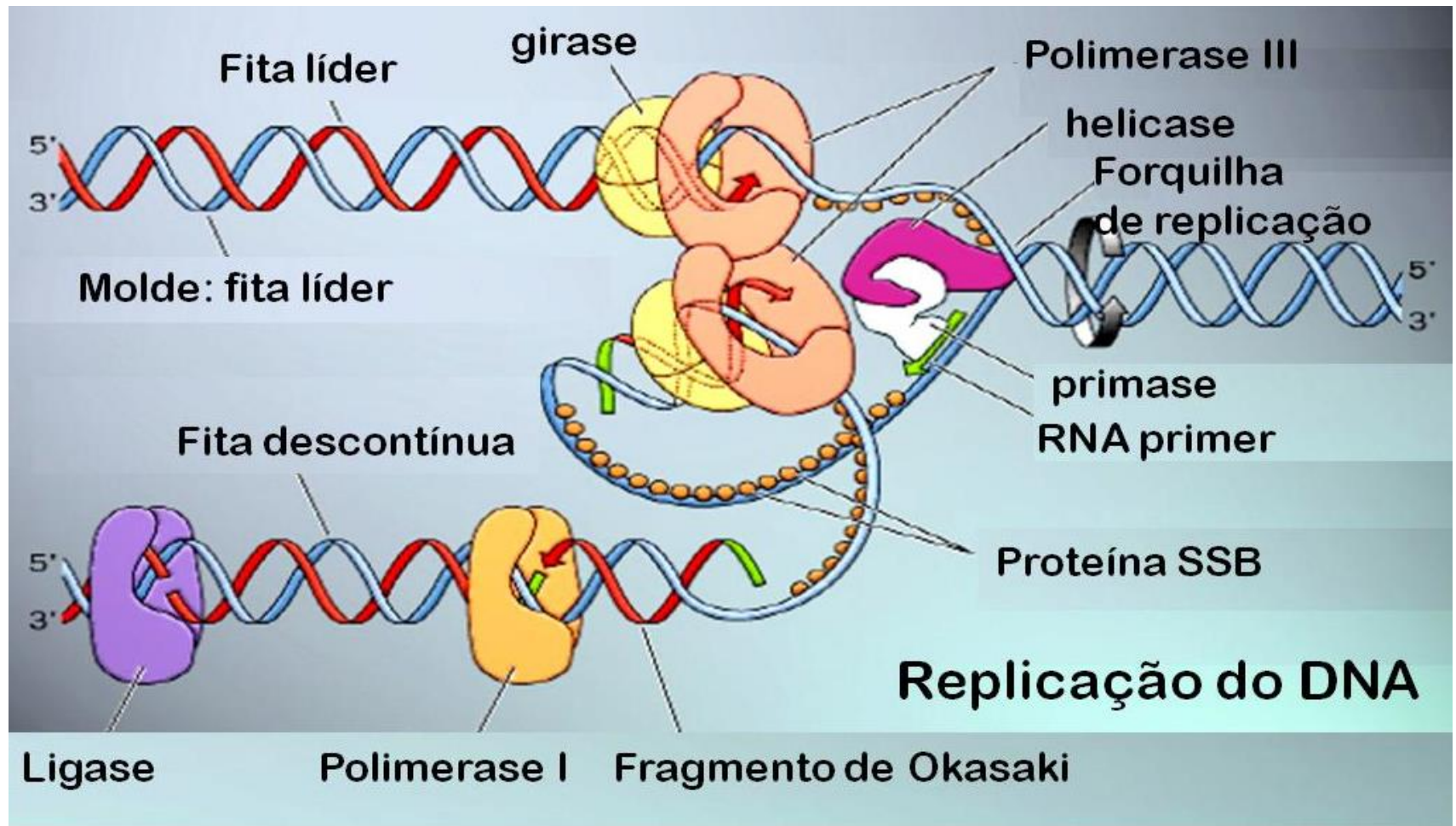
- Fragmentos de Okasaki ocorrem na fita descontínua

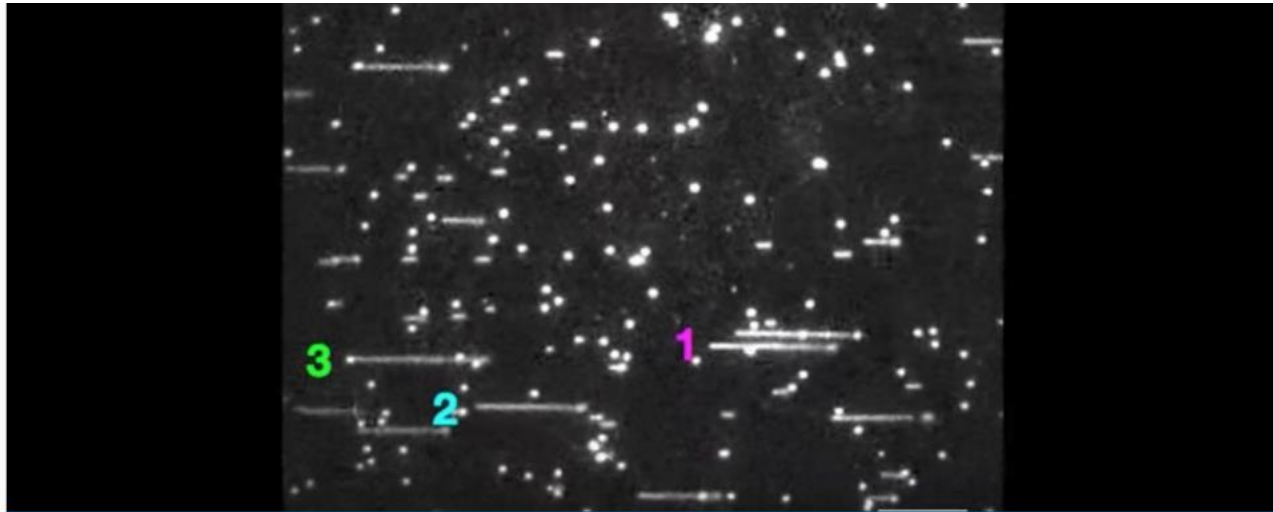
- A DNA polimerase III é responsável pela síntese da maior parte do DNA

- A DNA polimerase I remove o primer de RNA e preenche as lacunas

- A DNA ligase sela as quebras

Síntese das fitas contínua e descontínua é independente





James Graham/UC Davis

DNA Replication Has Been Filmed For The First Time, And It's Not What We Expected

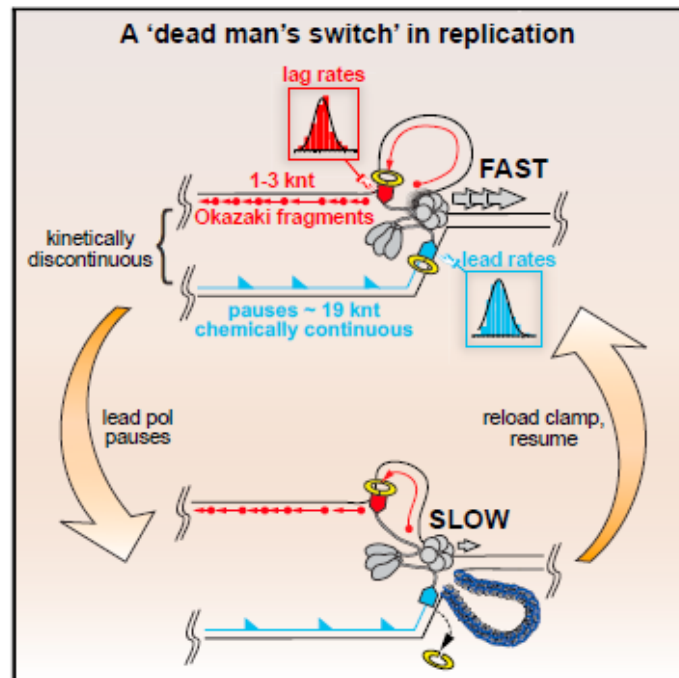
"It undermines a great deal of what's in the textbooks."

BEC CREW 19 JUN 2017

<http://www.sciencealert.com/dna-replication-has-been-filmed-for-the-first-time-and-it-s-stranger-than-we-thought>

Independent and Stochastic Action of DNA Polymerases in the Replisome

Graphical Abstract



Authors

James E. Graham, Kenneth J. Mariani,
Stephen C. Kowalczykowski

Correspondence

kmarians@sloankettering.edu (K.J.M.),
sckowalczykowski@ucdavis.edu (S.C.K.)

In Brief

Polymerases within the replisome operate independently and discontinuously, and they are not coordinated.

A replicação em eucariotos

REPLICAÇÃO DO DNA EM EUCARIOTOS

- ✓ É similar a procariotos, semiconservativa e bidirecional. Existe uma fita LÍDER e outra DESCONTÍNUA com fragmentos de Okazaki. Se inicia nas bolhas de replicação (MÚLTIPLAS FORQUILHAS);
- ✓ Várias origens de replicação (genoma de humanos e outros mamíferos contêm cerca de 10.000 mil origens de replicação distribuídas pelos cromossomos a intervalos de 30.000 a 300.000 pares de bases);
- ✓ Atuam enzimas similares as das células de procariotos;
- ✓ Nos fragmentos de Okasaky, os *primers* de RNA são removidos por uma Rnase e não por uma DNA polimerase de reparo;
- ✓ A finalização da replicação é feita com a formação de estruturas nas terminações do cromossomo, os telômeros;
- ✓ Os telômeros são replicados com a ajuda das telomerases .

REPLICAÇÃO DAS PONTAS DO CROMOSSOMO

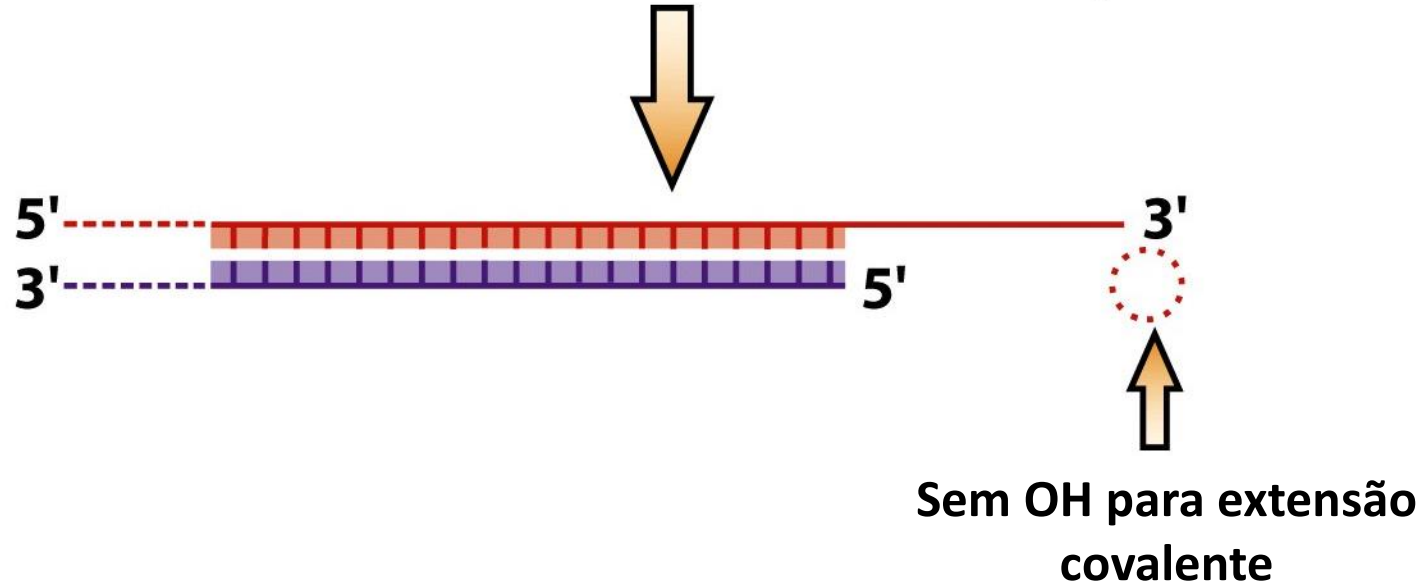
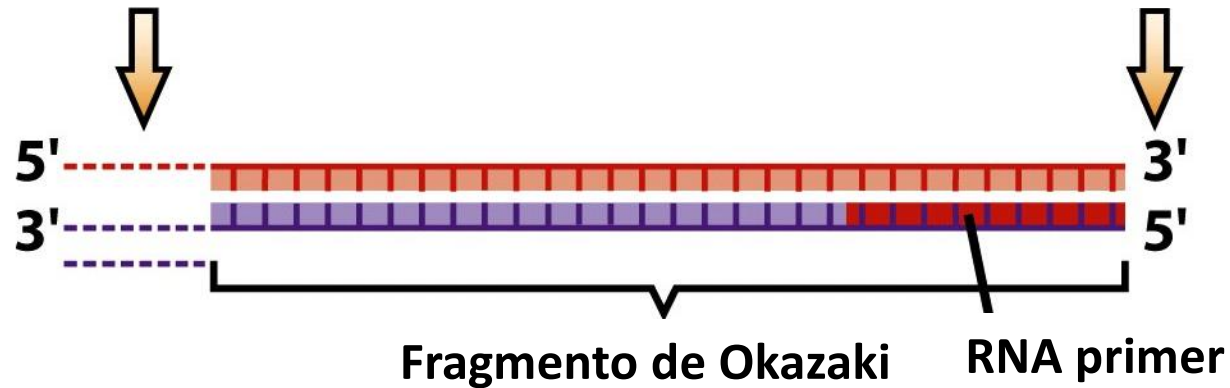
- DNA polimerase não pode replicar o segmento terminal do DNA do filamento descontínuo de um cromossomo linear;
- TELOMERO: tem uma estrutura única que favorece um mecanismo simples para a adição de telômeros feita pela enzima **telomerase** contendo RNA

Repetições dos telômeros de humanos:

TTAGGG

Próximo ao centrômero

Fim do cromossomo



Telomerase resolves the terminal primer problem.

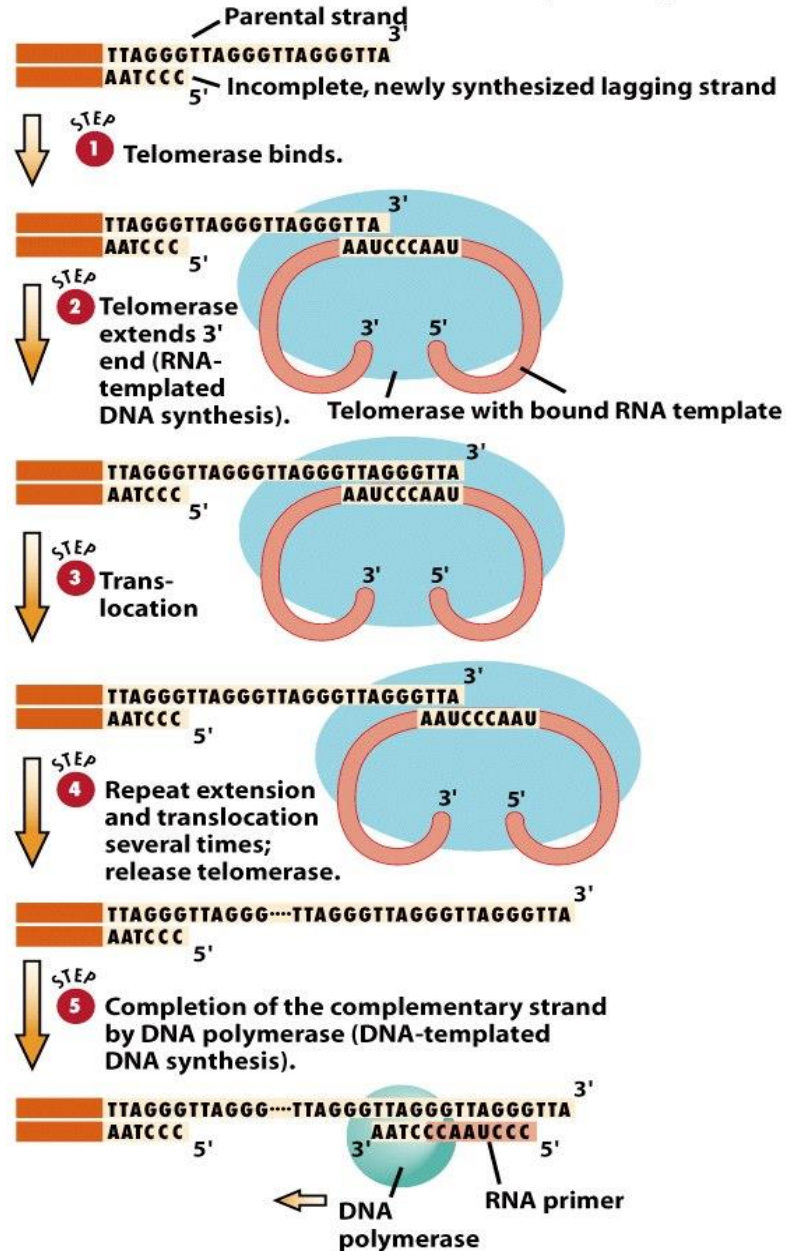
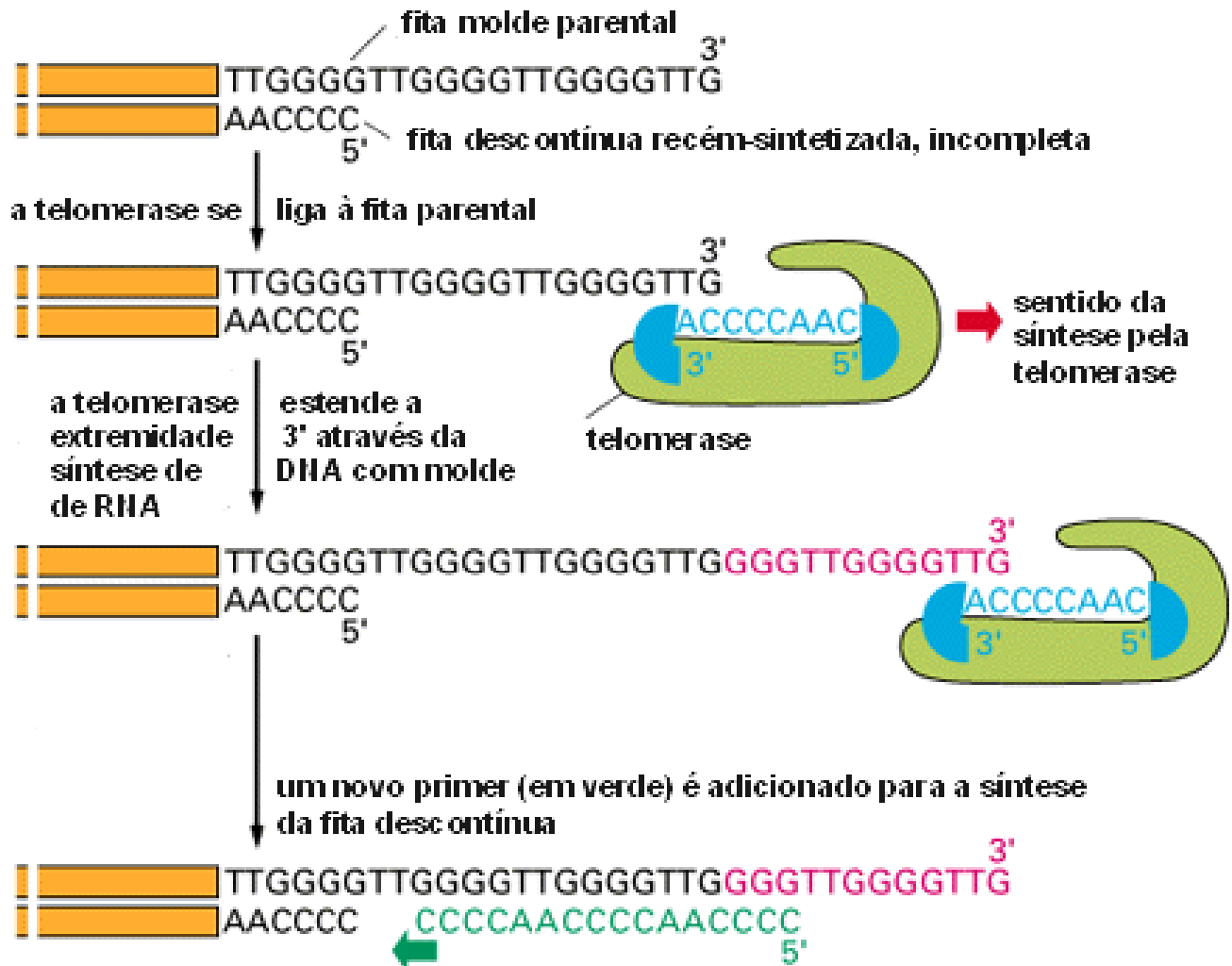


Figure 10-33b Principles of Genetics, 4/e
© 2006 John Wiley & Sons

AGORA ENTENDEU?



Progeria (envelhecimento prematuro):

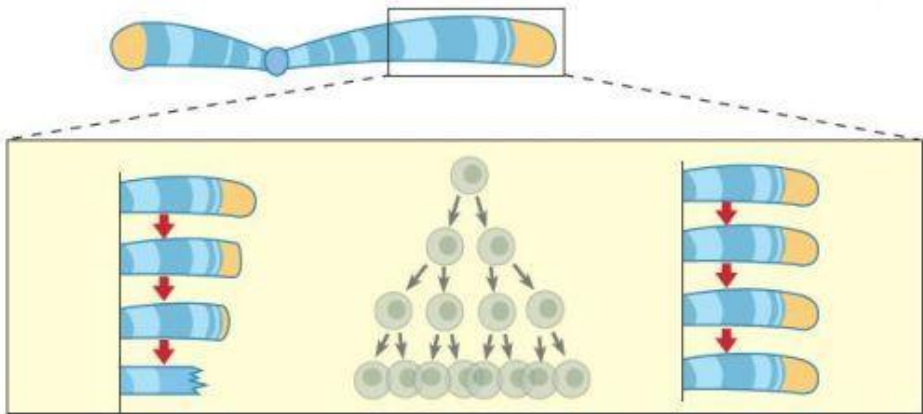
Síndrome de Hutchinson-Gilford: inicia-se imediatamente ao nascimento, morte na adolescência.

Síndrome de Werner: inicia-se na adolescência e morte aos 40 anos

John Tacket, 15 anos



Figure 10-34 Principles of Genetics, 4/e



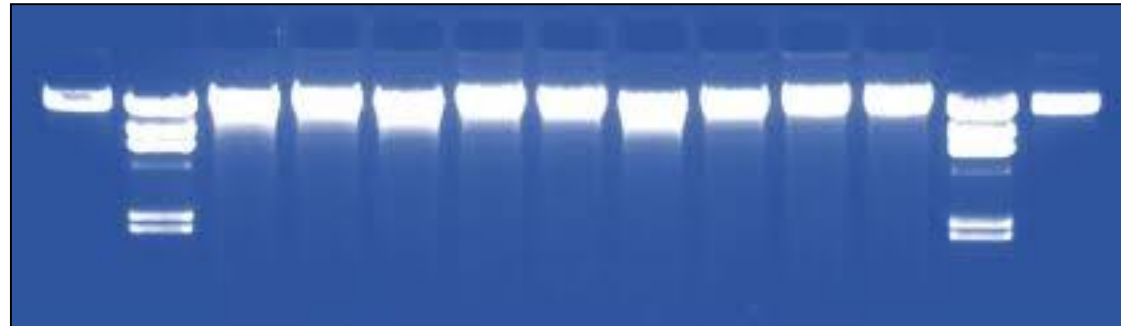
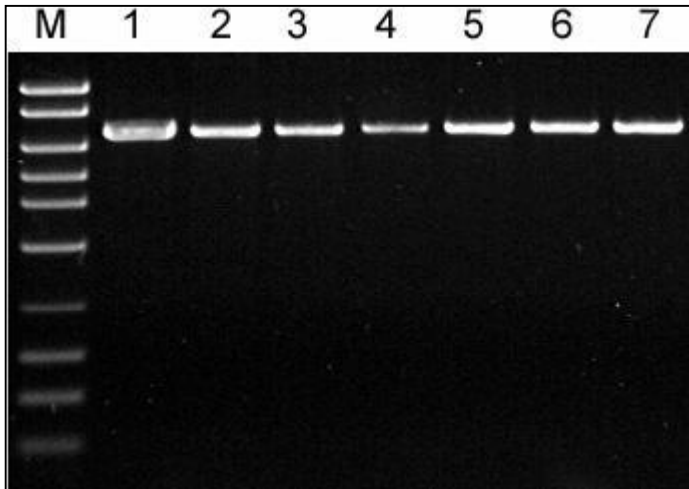
A replicação de DNA

<http://www.youtube.com/watch?v=4PKjF7OumYo>

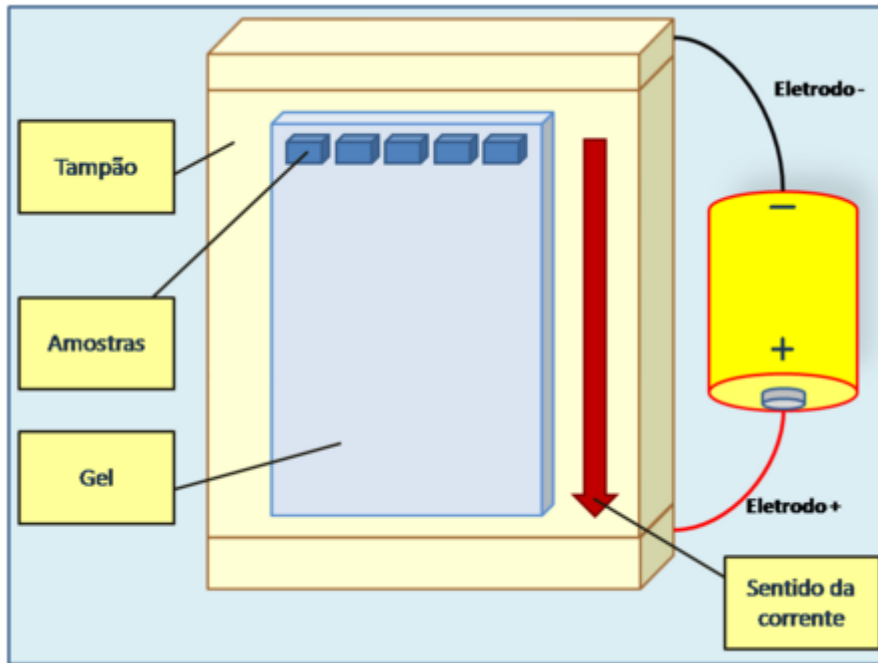
<https://www.youtube.com/watch?v=84aNPB9mSMM>



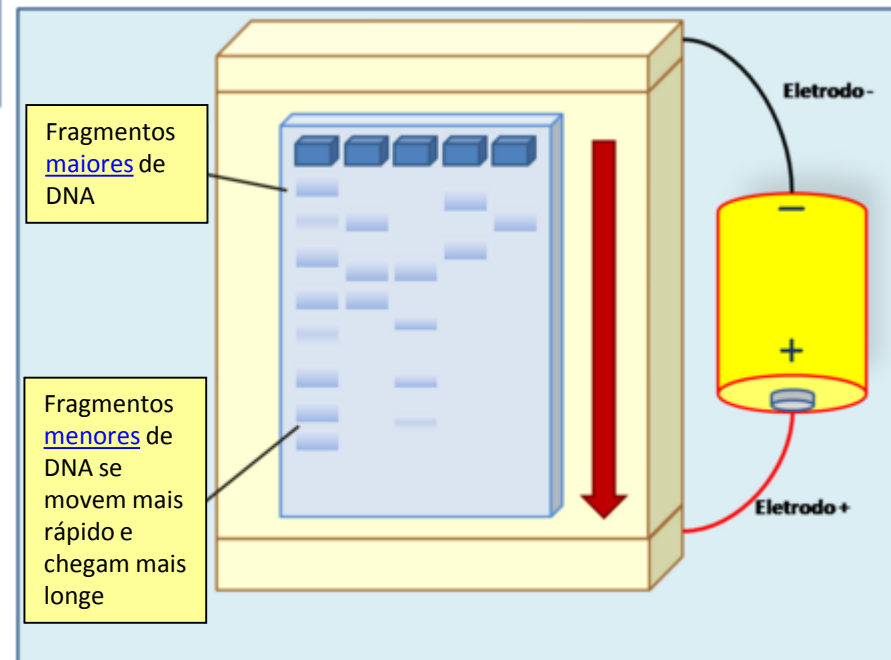
COMO EU VISUALIZO O DNA EXTRAÍDO?



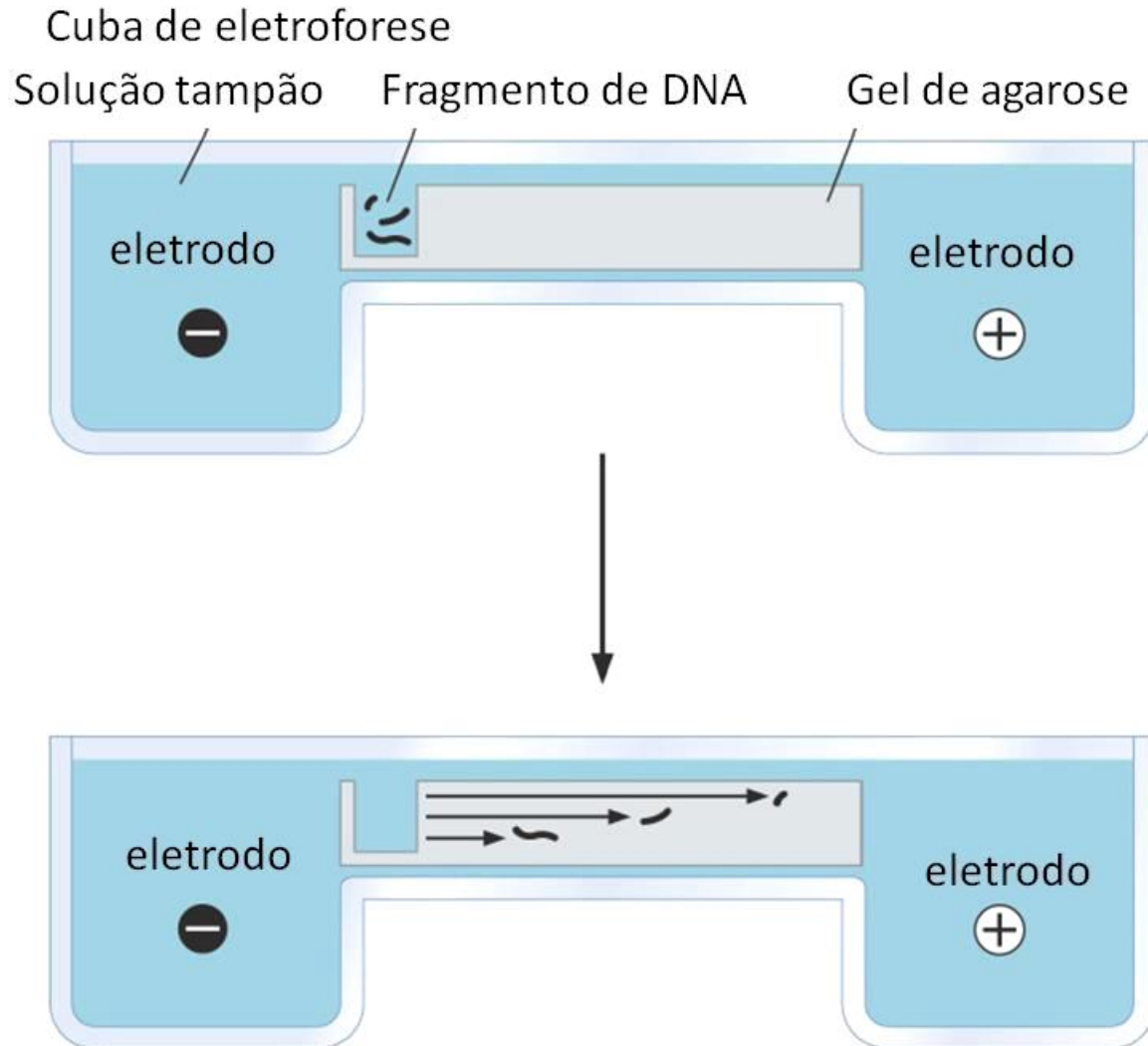
ELETROFORESE



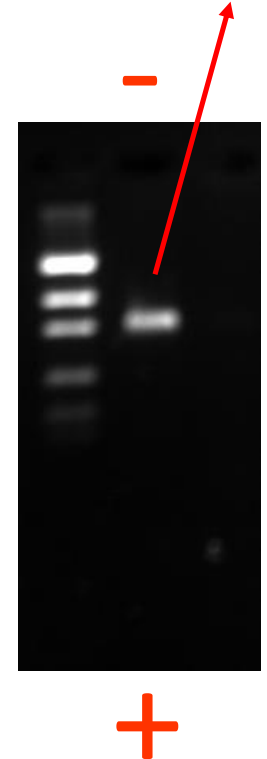
DNA sempre migra do polo negativo para o polo positivo!



SISTEMA DE ELETROFORESE



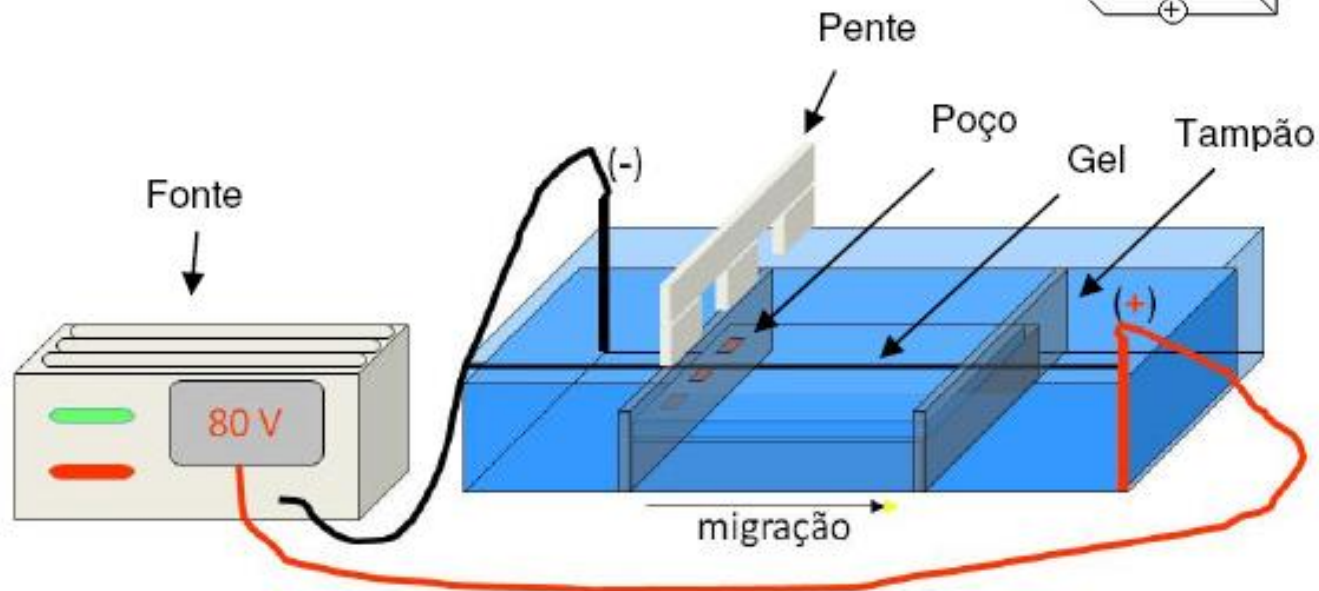
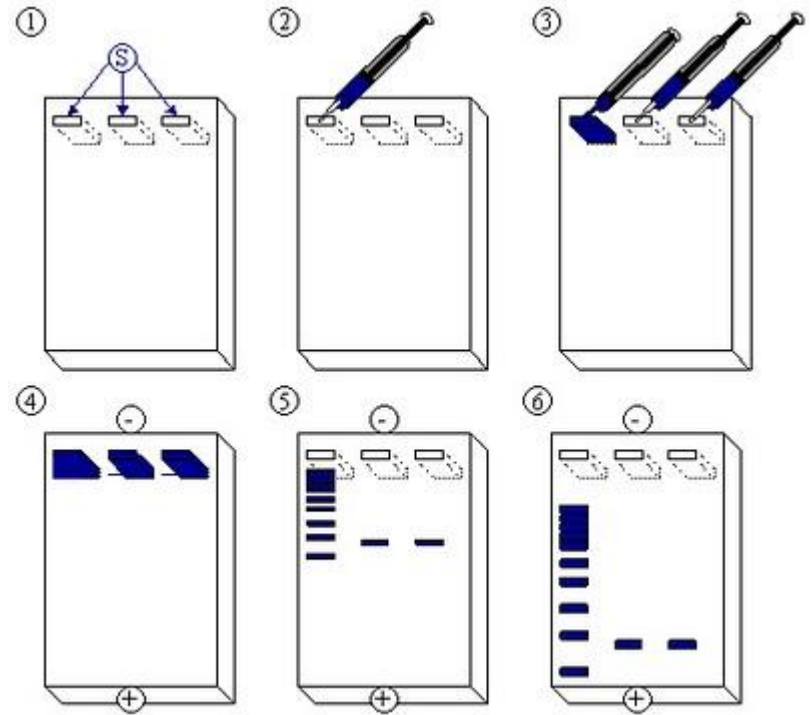
Fragmento de DNA



ELETROFORESE



Fonte de eletroforese



ANÁLISE DO RESULTADO

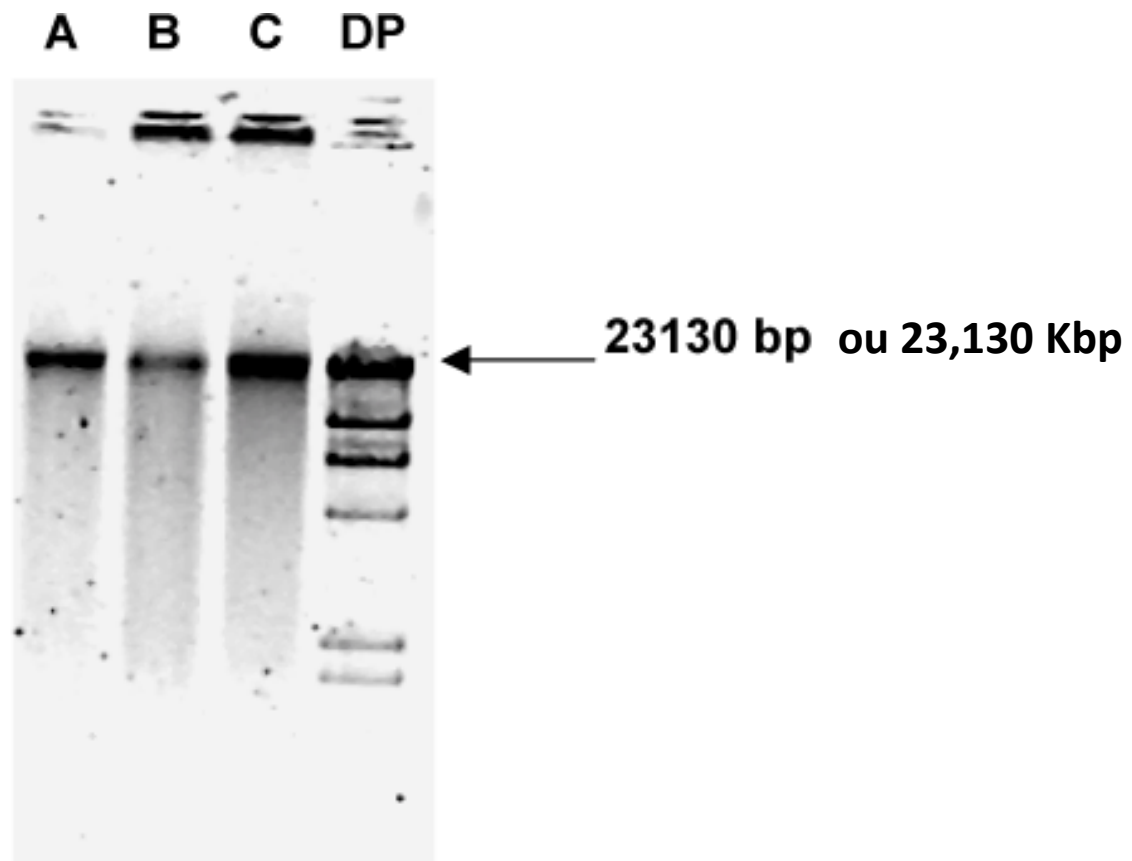


FIGURA 2 - Perfil eletroforético de DNA [1000 ng/μl] extraído de folhas de *Passiflora* spp. pelos métodos **A.** Tai & Tansley (1991), **B.** Cheung *et al.* (1993) e **C.** Doyle & Doyle (1991). **DP**=DNA padrão (Hind III) (Londrina, 2000)

GEL DE ELETROFORESE

<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>



ESTUDO DIRIGIDO

1. Como extrair ácidos nucleicos (procedimentos e reagentes);
2. Componentes do tampão de extração de DNA;
3. Processo de replicação
4. Enzimas envolvidas na replicação de DNA
5. Como visualizar o DNA extraído?

Capítulo 6 – Replicação, reparo e recombinação de DNA (páginas 197 a 215)

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2011. ***Fundamentos da Biologia Celular***. 3ª Edição brasileira. Artmed, Porto Alegre

Leitura do texto – Extração de DNA de plantas

