

LGN0232 - Genética Molecular

**Tecnologia do DNA recombinante:
Histórico, Enzimas de Restrição e Vetores**

Antonio Figueira

CENA

figueira@cena.usp.br

Tecnologia do DNA Recombinante?

O que é recombinação?

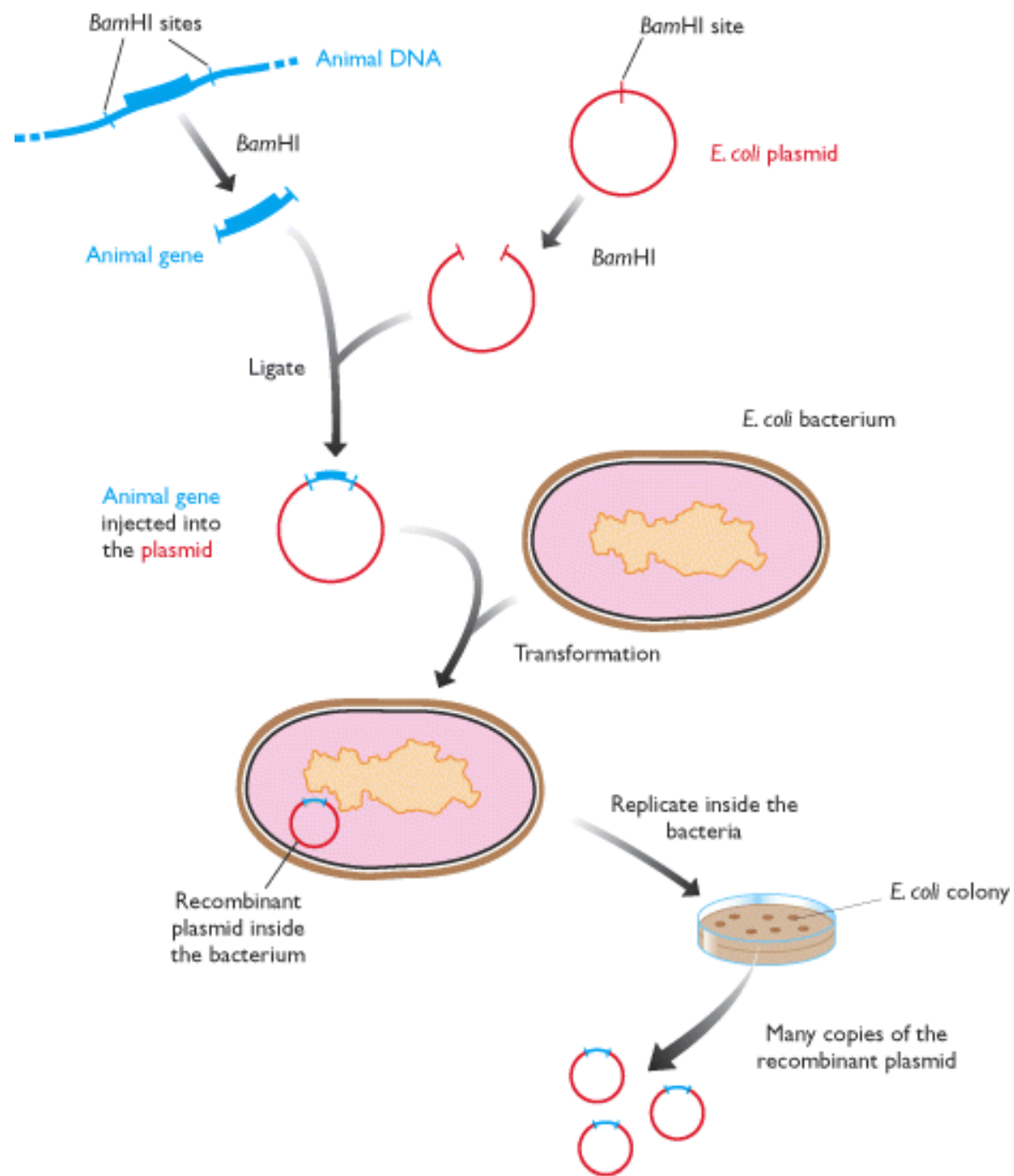
Recombinação de DNA

A troca de fragmentos de DNA necessita de processos naturais como:

- Sexo – barreira específica (espécie)
 - Conjugação – troca de material genético em bactérias
 - Transferência horizontal?
-
- 1970s – DNA Recombinante – rompeu barreiras de espécies

Tecnologia do DNA Recombinante

- Ligar 2 ou + fragmentos de DNA, gerando molécula capaz de replicação autônoma em hospedeiro
- Permite identificar, isolar e multiplicar genes ou sequencias de qualquer organismo
- Também denominada popularmente de “**engenharia genética**”



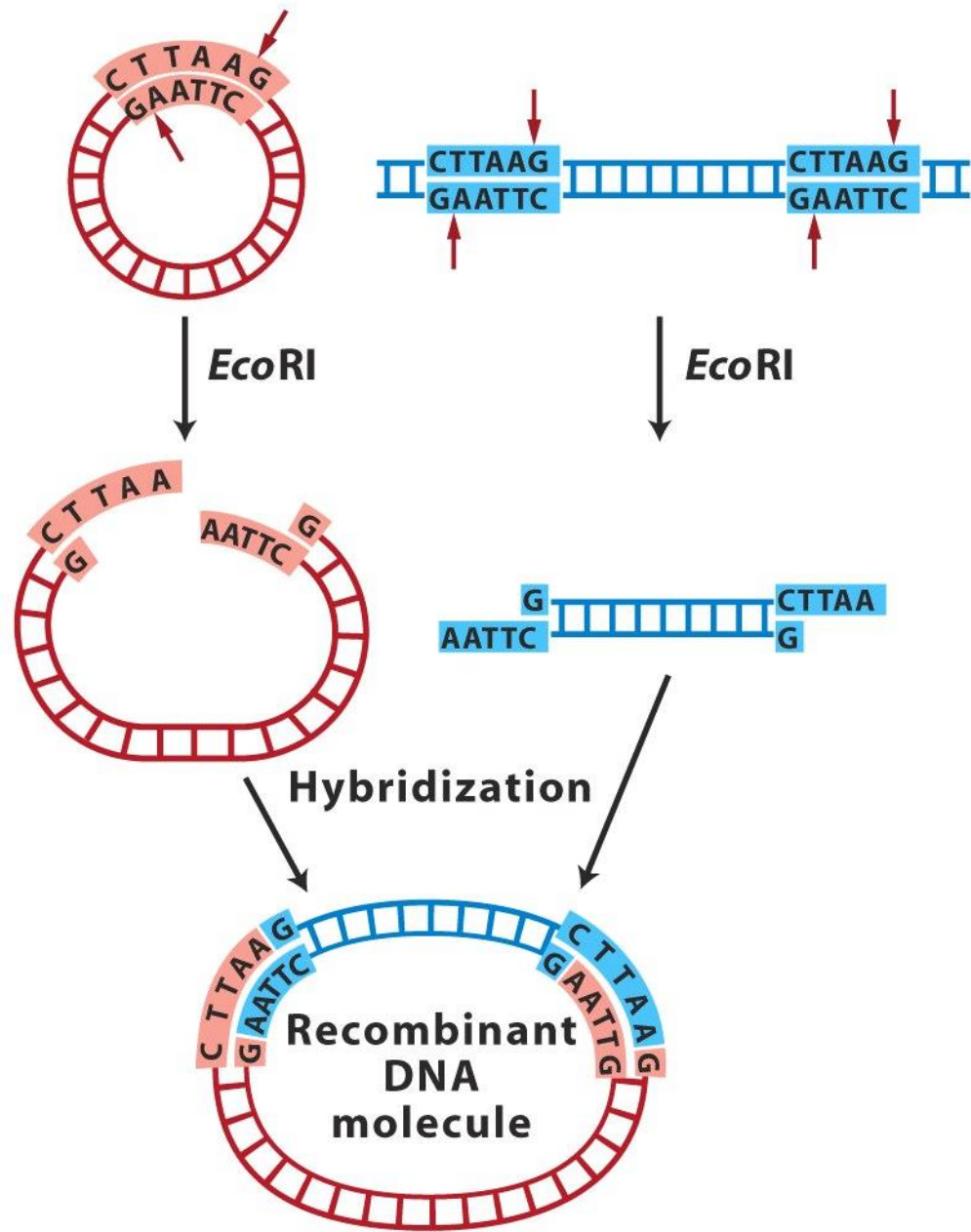
Tecnologia do DNA Recombinante

Base das técnicas de DNA recombinante

- enzimas que modificam ácidos nucleicos
- síntese, degradação, ligação ou remoção de partes dos ácidos nucleicos de forma direcionada

Enzimas

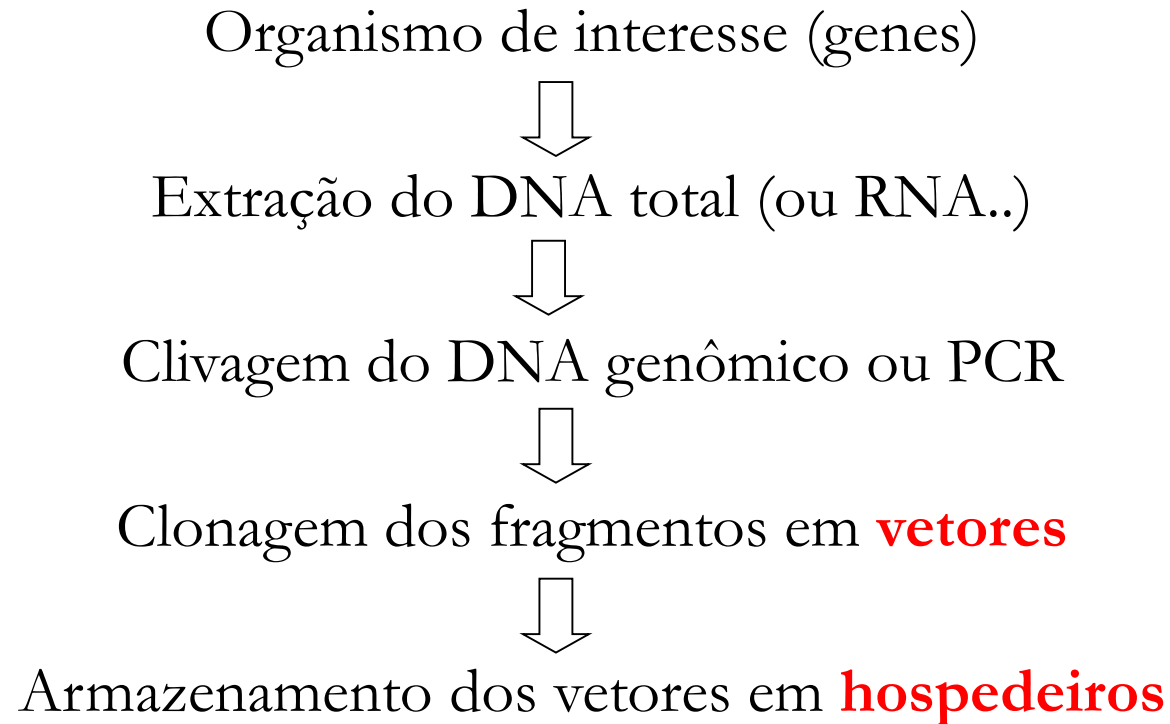
- Enzimas de restrição - **corte**
- Ligases - **ligação**
- DNA Polimerases - síntese
- Quinases e fosfatases - modificação de terminações (alteração de PO_4^+)



Formação de uma
molécula de
DNA recombinante

Tecnologia do DNA Recombinante

Como fazer um DNA recombinante?



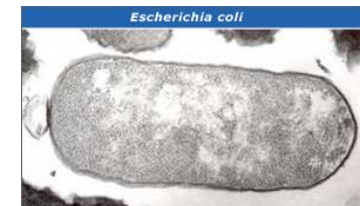
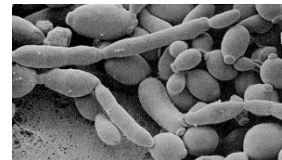
Atores no DNA Recombinante

Enzimas: **enzimas de restrição**
 DNA ligase

Vetores: **plasmídeos**
 fagos (vírus de bactérias)
 cosmídeos
 cromossomos artificiais (YAC, BAC)

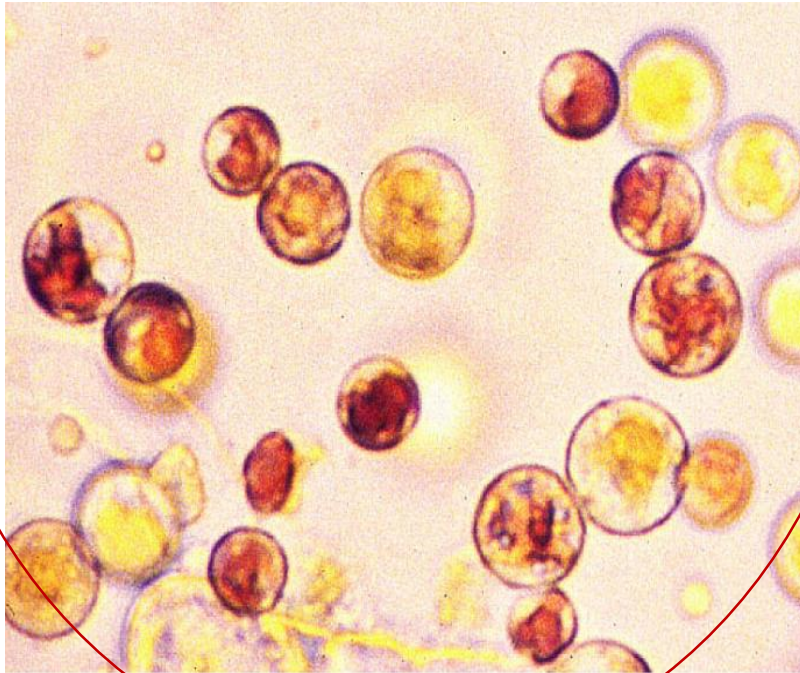


Hospedeiros: ***Escherichia coli***
 leveduras
 células animais
 células vegetais
 células de insetos,..



PRECISA ISOLAR, CLONAR O DNA, MAS COMO?

Clonagem dependente
de células



Clonagem independente de
células (PCR)



Histórico

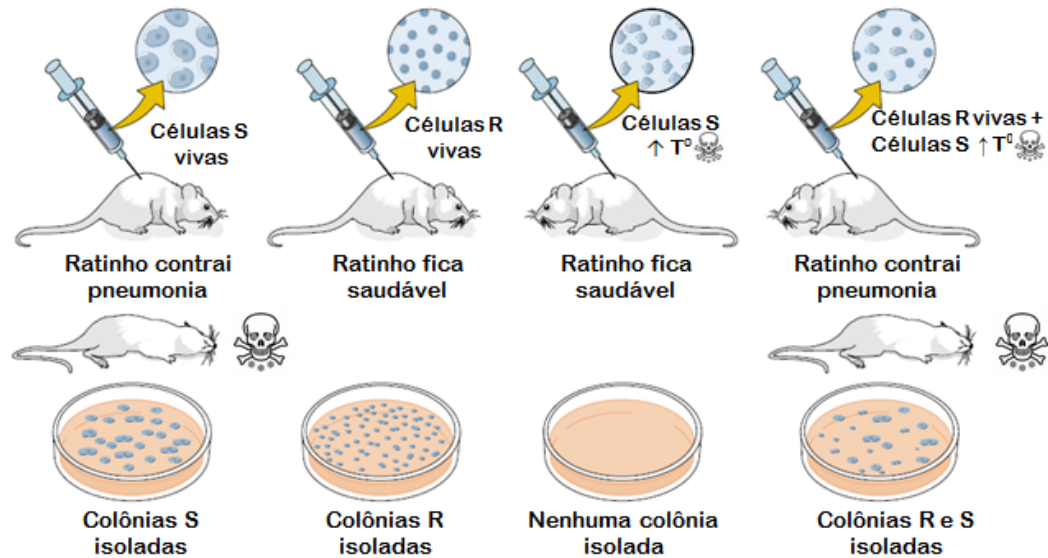
Como chegamos até a tecnologia do
DNA Recombinante?

Histórico

- 1864: Gregor Mendel e as ervilhas
- 1869: Johann Friedrich Miescher – **nucleína** – rica em fósforo
- 1910: Thomas Hunt Morgan – genes em cromossomos - *Drosophila*
- 1929: Phoebus Levene – definiu composição de nucleotídeos
- 1928: Frederick Griffith – definiu “princípio transformante” em *Streptococcus pneumoniae* e camundongos
- 1944: Oswald Avery – definiu princípio transformante como DNA!
- 1952: Hershey & Chase – definiu que vírus possuem DNA
- 1953: Watson & Crick – estrutura do DNA...



1928 - Frederick Griffith



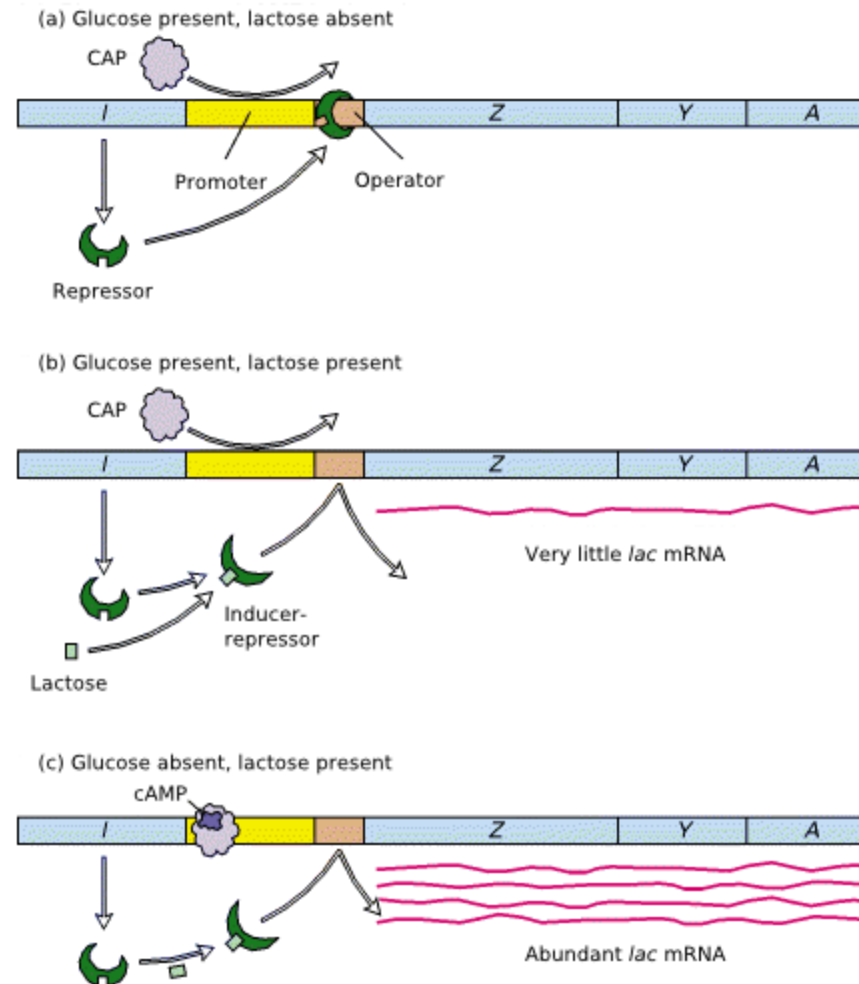
Material genético das bactérias virulentas (mortas) foi responsável pela transformação das bactérias não virulentas (vivas)

1944 - Oswald Avery, Collin MacLeod & MacLyn McCarthy

- 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



The Operon: A Group of Genes Whose Expression is Coordinated by an Operator

By François Jacob, David Perrin, Carmen Sanchez
and Jacques Monod

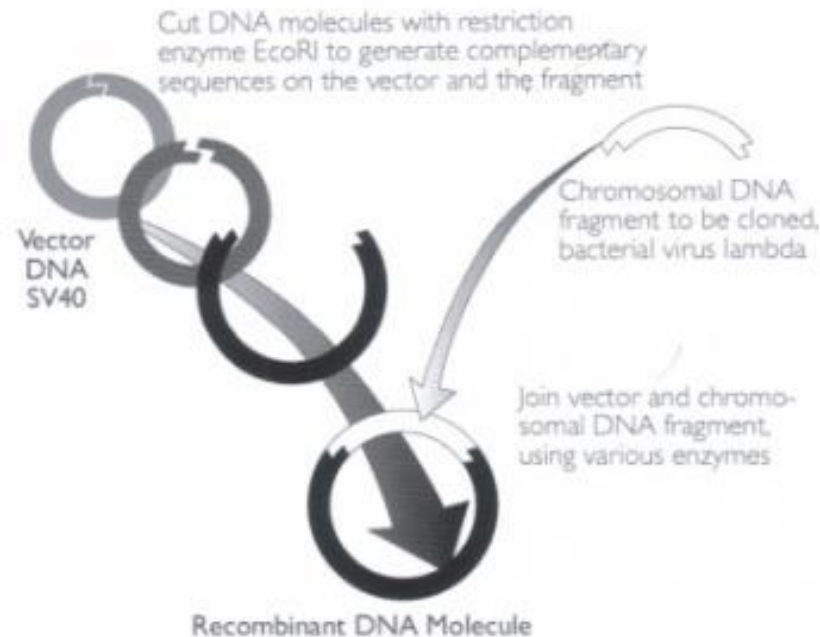
Units of galactosidase and of Cz protein [cf. (3)] expressed as the percentage of the amount found for the allele present on the chromosome in induced bacteria.

Units of permease [cf. (5)] in percentage of the amount found in induced bacteria.

nd, not detectable. The excess of the product of the z allele present on the factor F-lac seems to indicate the presence of several F-Lac factors per chromosome ⁽²⁾ ⁽³⁾.

GENOTYPE		NON-INDUCED BACTERIA			INDUCED BACTERIA		
<i>Chromosome</i>	<i>F-Lac</i>	<i>Galactosidase</i>	<i>Protein Cz</i>	<i>Permease</i>	<i>Galactosidase</i>	<i>Protein Cz</i>	<i>Permease</i>
$i^+o^+z^+y^+$		<1	—	nd	100	—	100
$i_3^-o^+z_4^-y^+/Fi^+o^+z^+y^+$		<1	nd	nd	320	100	100
$i_3^-o^+z_4^-y^+/Fi^+o^c z^+y^+$		36	nd	33	270	100	100
$i^+o^+z_1^-y^+/Fi^+o^c z^+y^+$		110	nd	50	330	100	100
$i^+o^+z^+y_R^-/Fi^+o^c z_1^-y^+$		<1	30	—	100	400	—
$i^+o^+z_1^-y^+/Fi^+o^c z^+y_R^-$		60	—	nd	300	—	100

1972: Paul Berg realizou a primeira experiência bem sucedida onde foram ligadas duas cadeias genéticas diferentes: uma cadeia de DNA do **fago λ** 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 new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA **69**, 2904-2909 (October 1972).

1973: Stanley Cohen & Herbert Boyer demonstraram a viabilidade da técnica do DNA recombinante

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

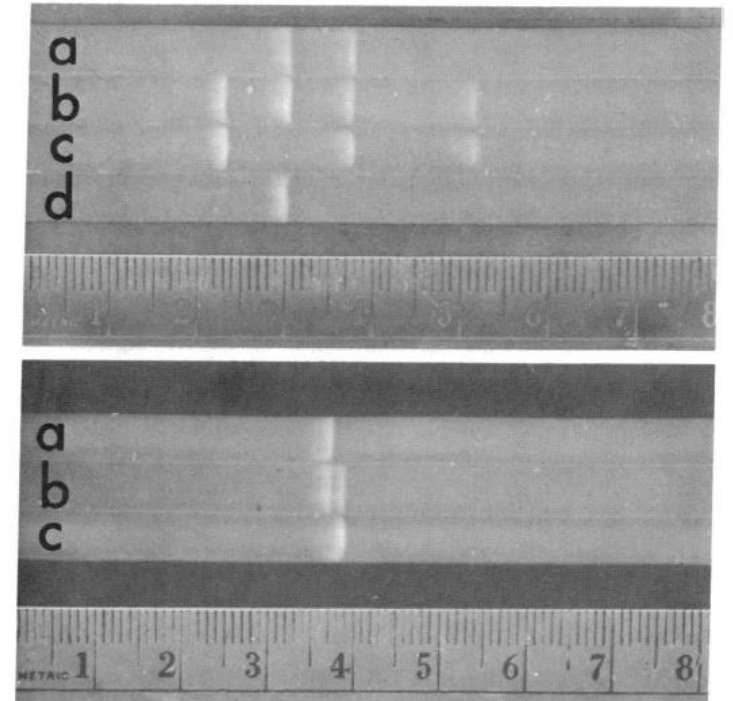
Communicated by Norman Davidson, July 18, 1973

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-

EcoRI-generated fragments have been inserted into appropriately-treated *E. coli* by transformation (7) and have been shown to form biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences of both parent DNA species.

MATERIALS AND METHODS

E. coli strain W1485 containing the RSF1010 plasmid, which



1973: Cohen & Boyer

- 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.

Atores no DNA Recombinante

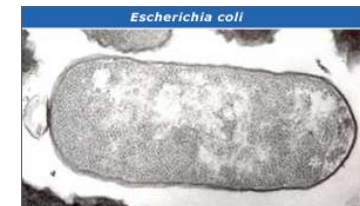
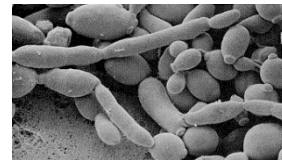
Enzimas: **enzimas de restrição**
 DNA ligase

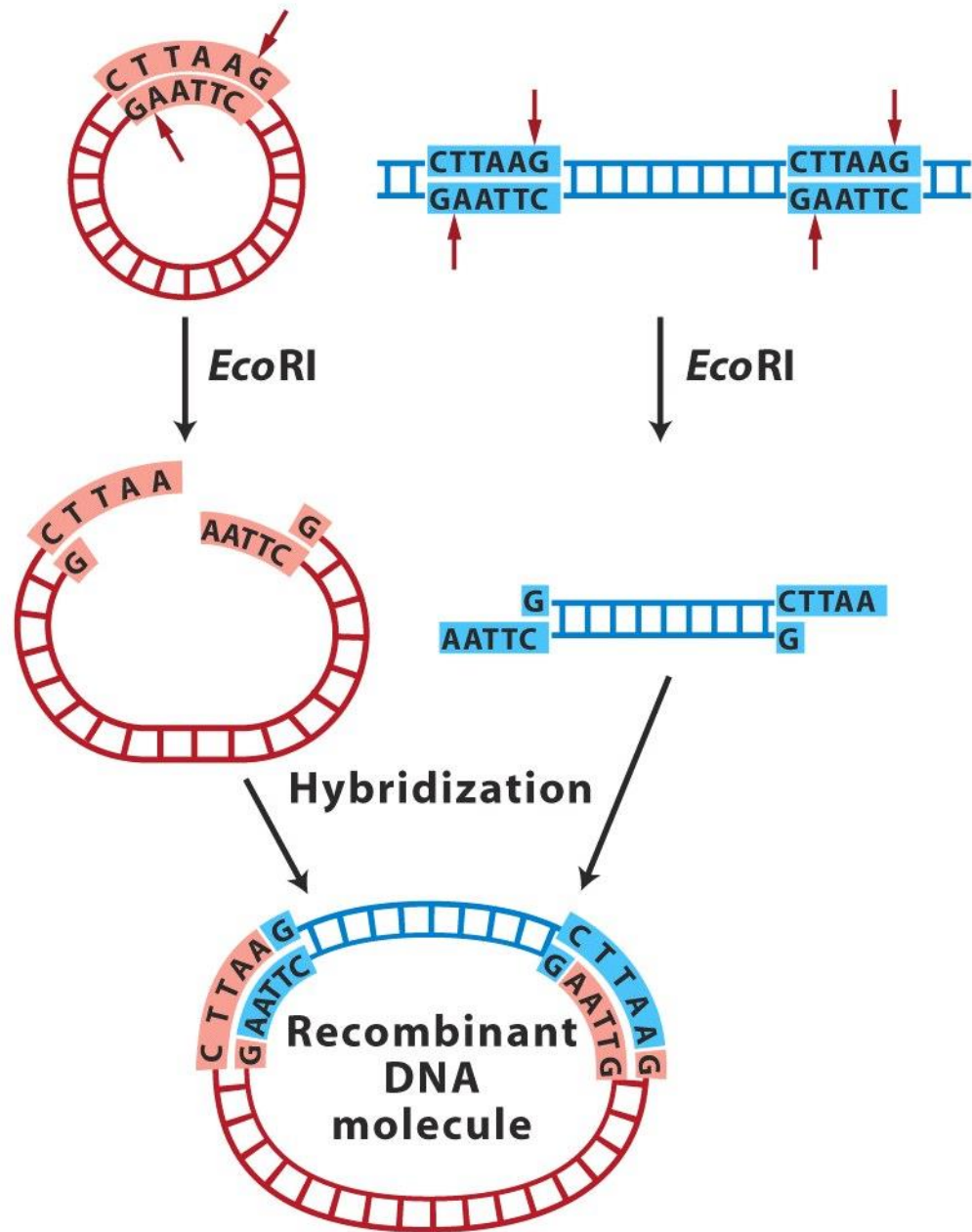
Vetores: **plasmídeos**
 fagos (vírus de bactérias)
 cosmídeos
 cromossomos artificiais (YAC, BAC)



Hospedeiros: ***Escherichia coli***

leveduras
células animais
células vegetais
células de insetos,..

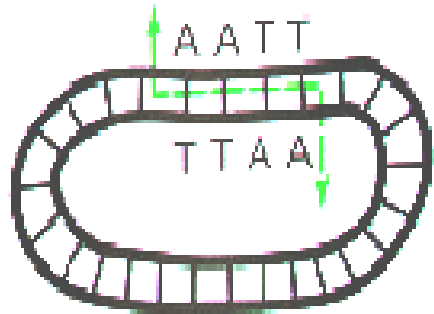




Formação de uma
molécula de DNA
recombinante

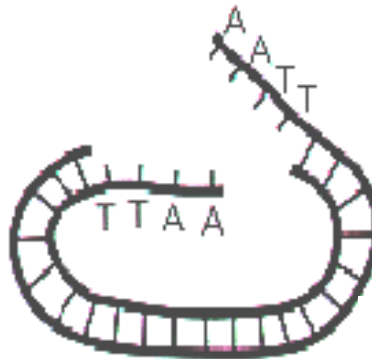
Construção de DNA Recombinante

Molécula de DNA de um plasmídeo **circular**



Clivagem com enzima de restrição

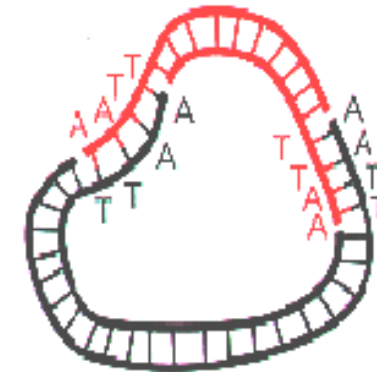
Molécula de DNA de um plasmídeo **linear** com extremidades coesivas



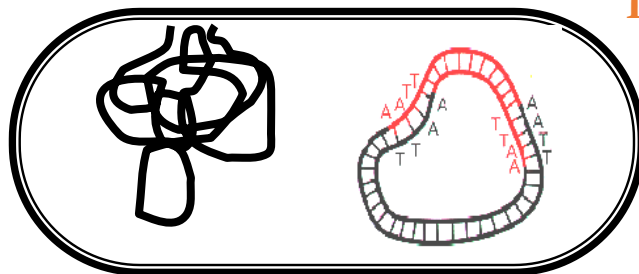
DNA exógeno



Ligação covalente pela DNA ligase

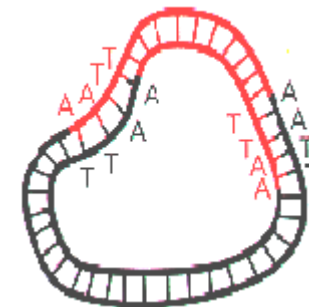


Inserção em uma célula hospedeira



Transformação

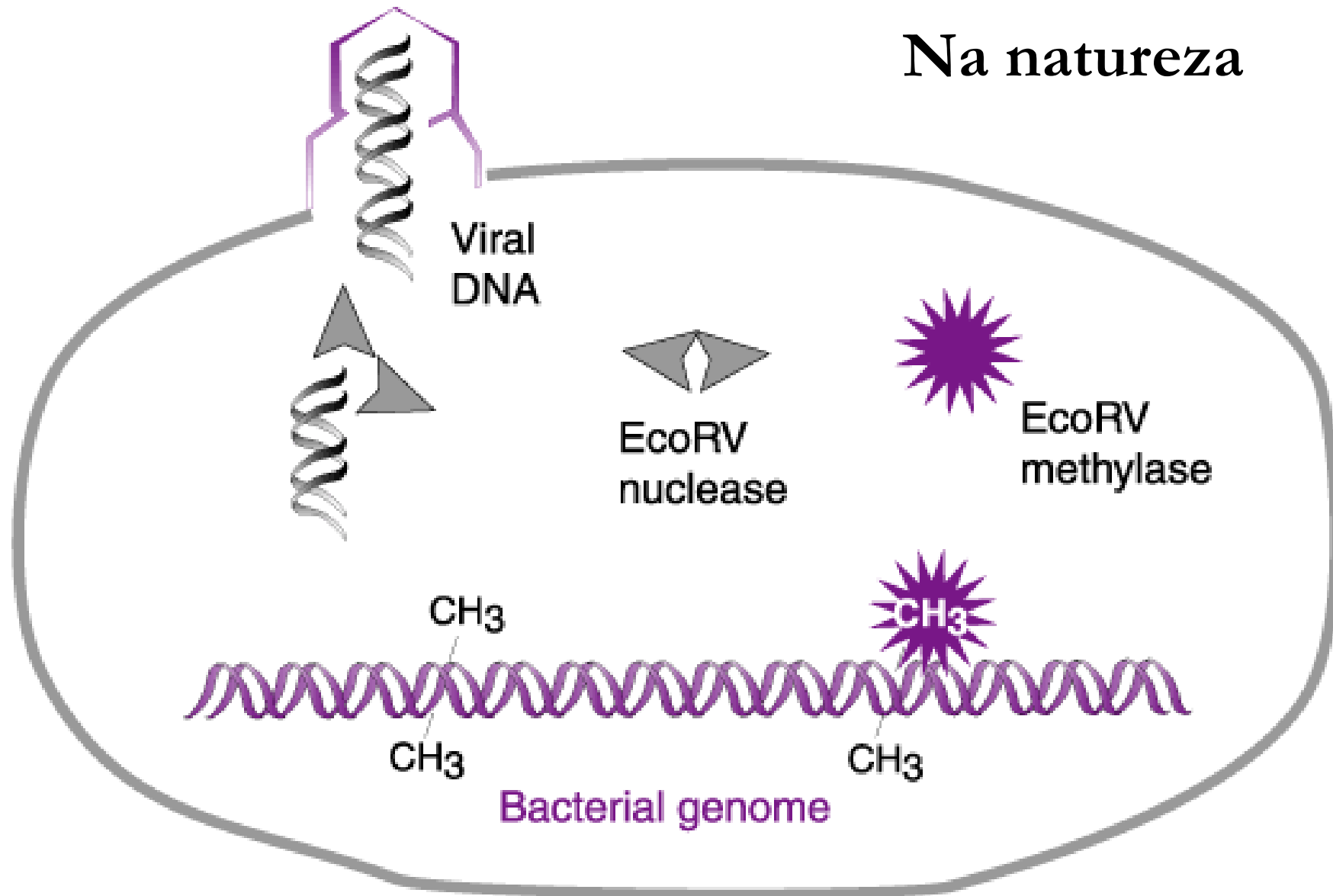
Molécula de DNA plasmidial contendo o **inserto**



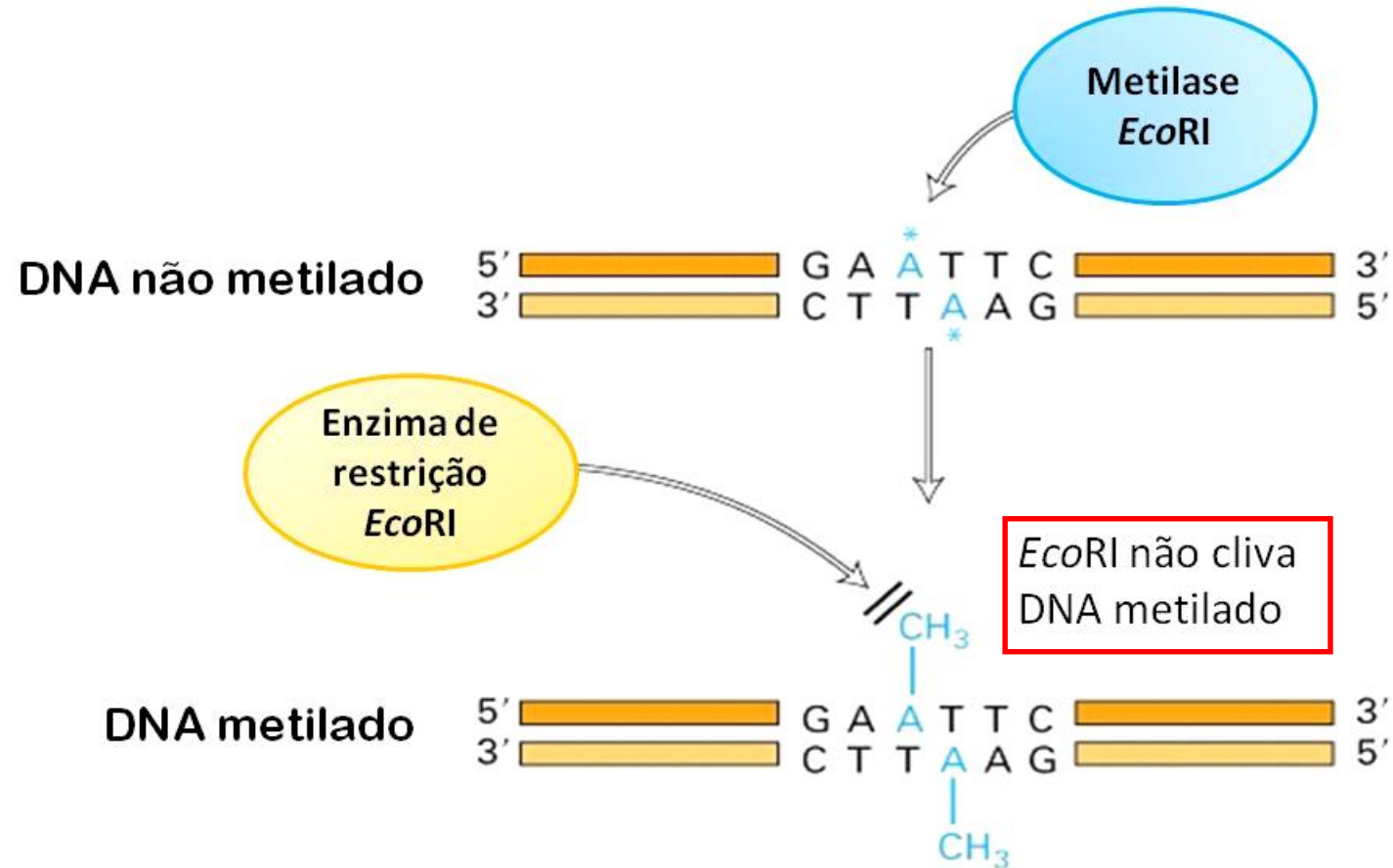
Enzimas de Restrição

- Endonucleases de restrição
- Bacteriófagos - > vírus que infectam bactérias
- 1950s - fagos infectam cepas específicas
 - certos fagos “restritos” a certas cepas (Luria)
- 1962 - endonuclease clivam DNA não protegido
 - DNA não protegido degradado por endonuclease restringindo infecção
- 1968 - purificação 1^a endonuclease de restrição
- 1970 - purificação e caracterização *Hin* dII
 - corte mesmo sítios - mapa de restrição *Simian Virus* 40

Na natureza



Enzimas de Restrição: Sistemas de Restrição/Modificação

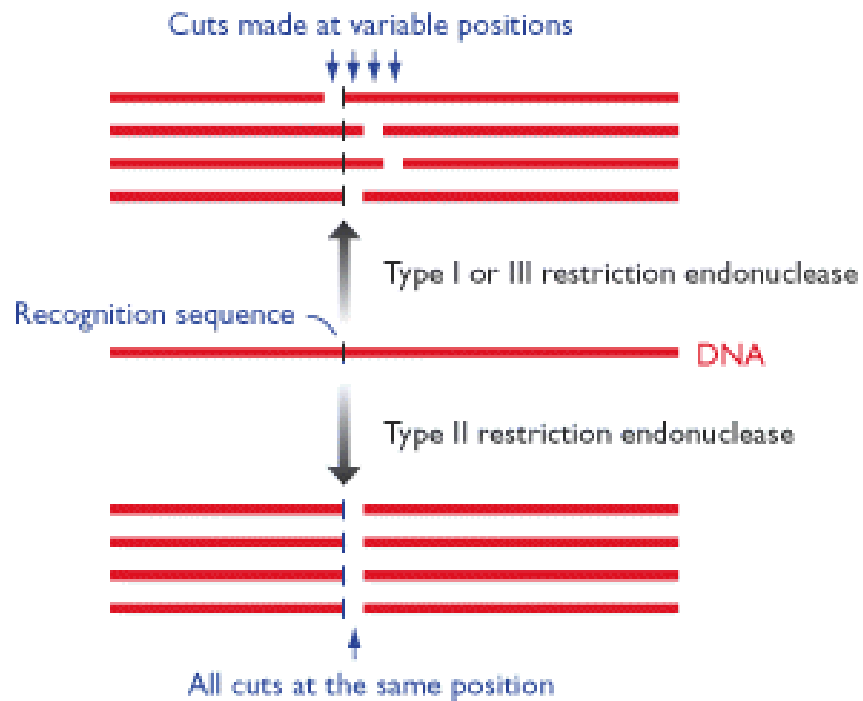


Características de Enzimas de Restrição

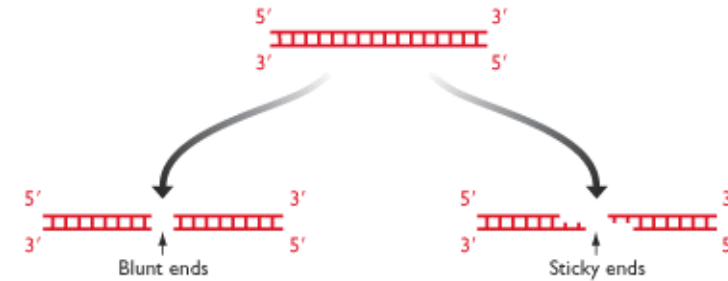
- Enzimas de restrição são endonucleases;
- Enzimas pp. de bactérias
- Diferentes linhagens de bactérias expressam enzimas de restrição
- O nome da enzima é derivado do nome da linhagem e espécie bacteriana em que foi isolada;
- Cortam (hidrolisam) DNA em fragmentos definidos e reproduzíveis;
- Ferramenta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

Tipos de Terminação

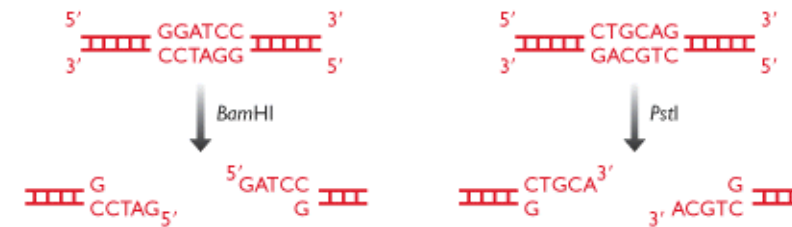
Tipos de Enzimas de Restrição



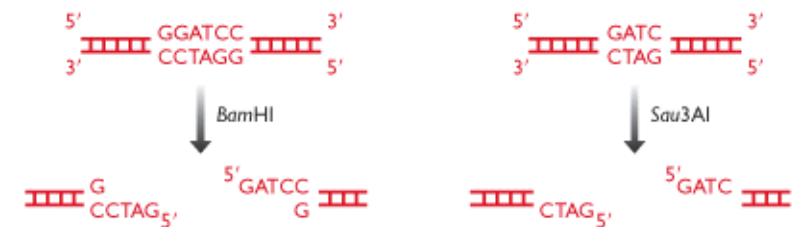
(A) Blunt and sticky ends



(B) 5' and 3' overhangs



(C) The same sticky end produced by different enzymes

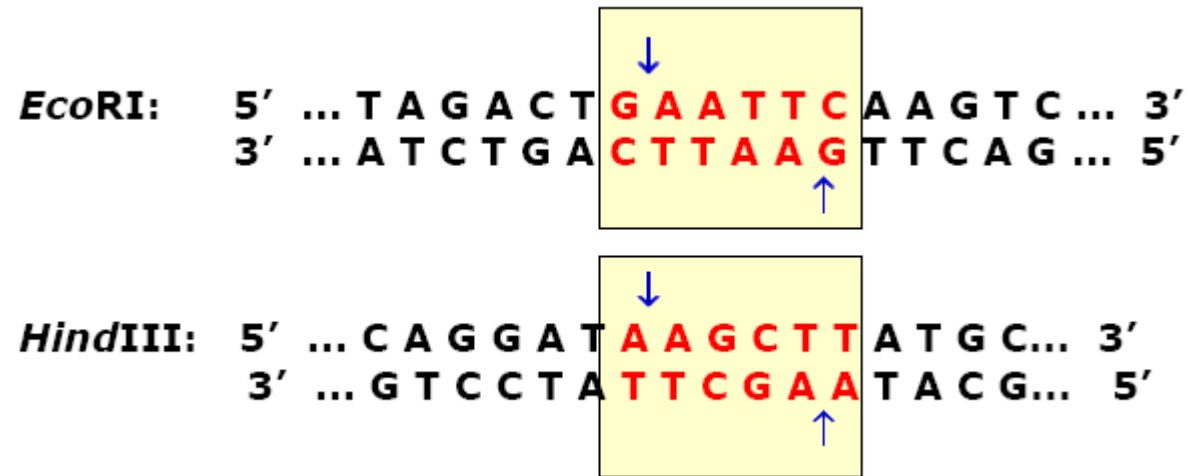


Extremidade coesiva

Extremidade cega

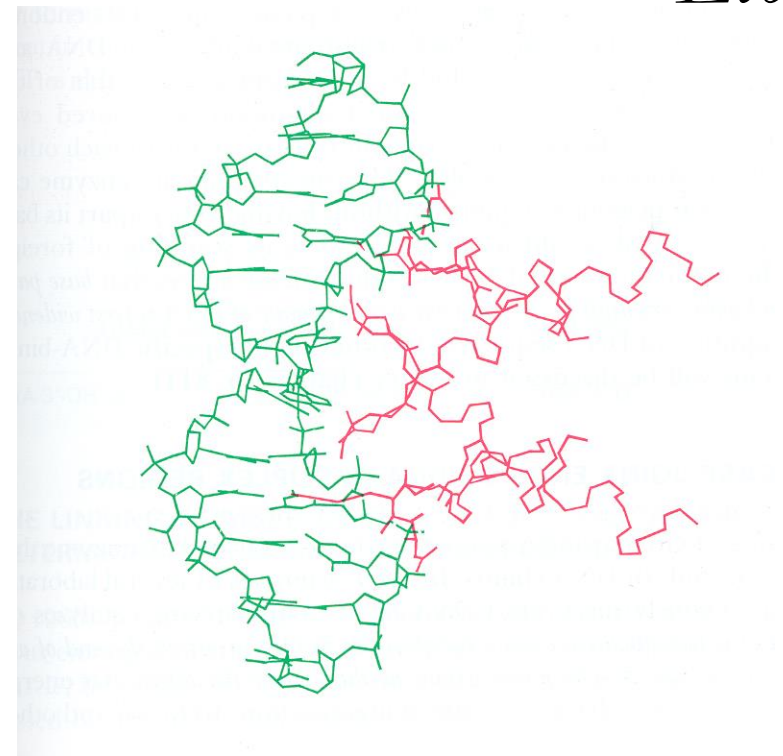
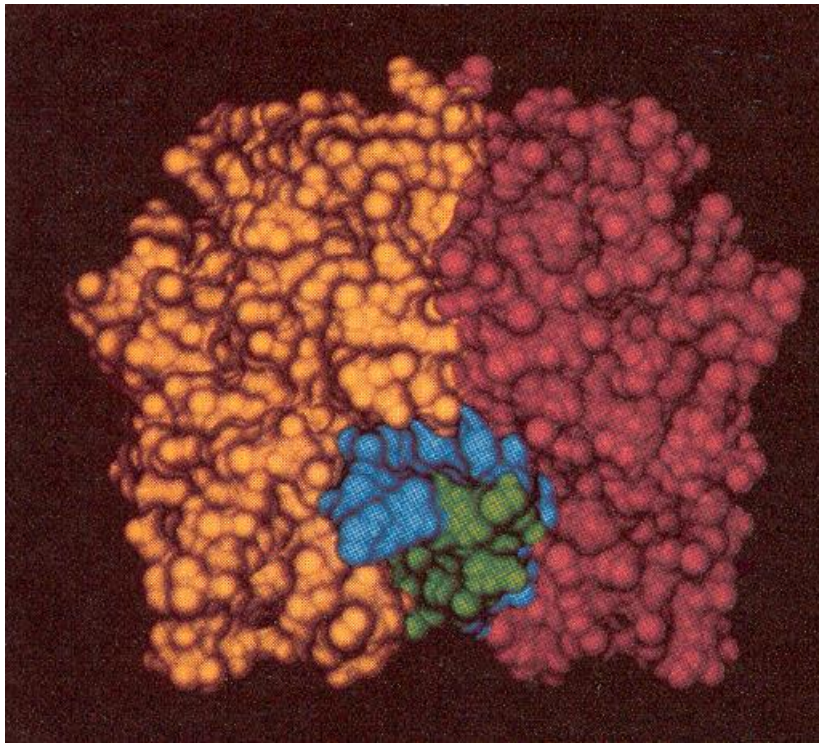
Enzimas de Restrição

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



Enzimas de Restrição

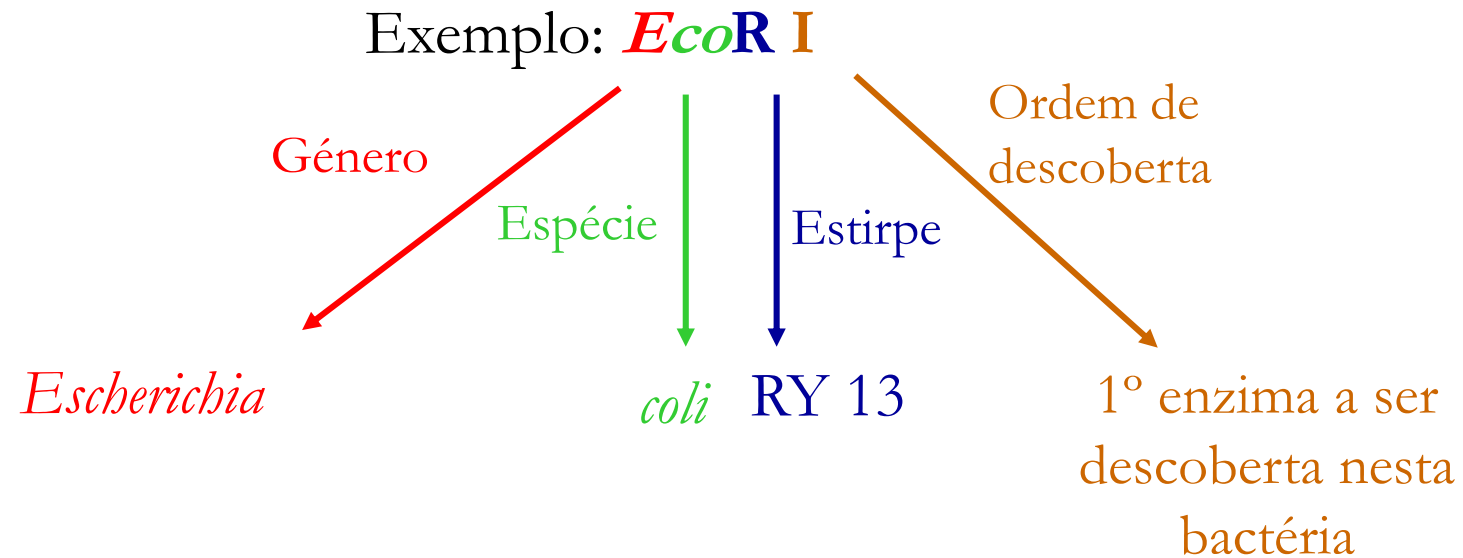
EcoRI



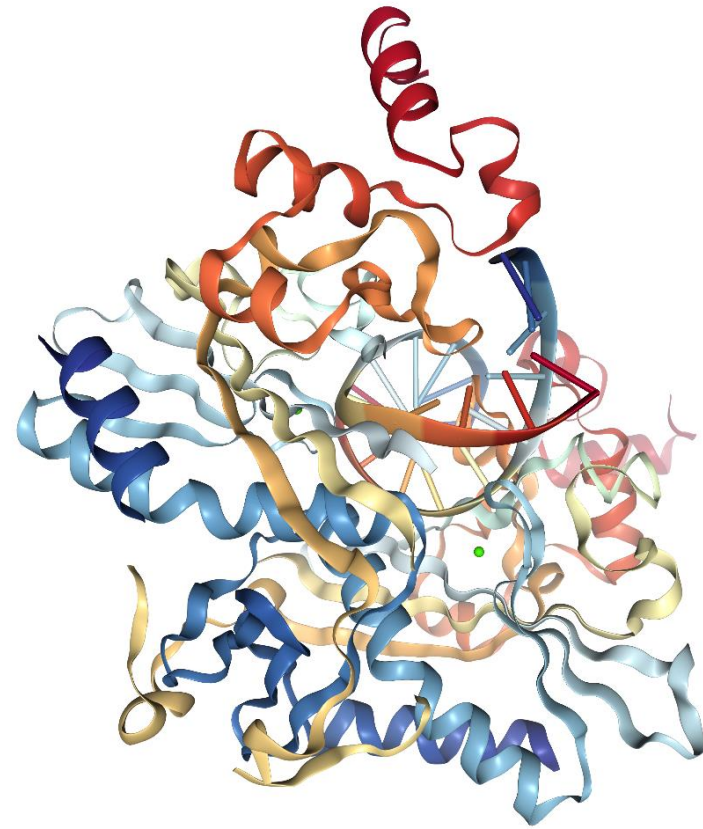
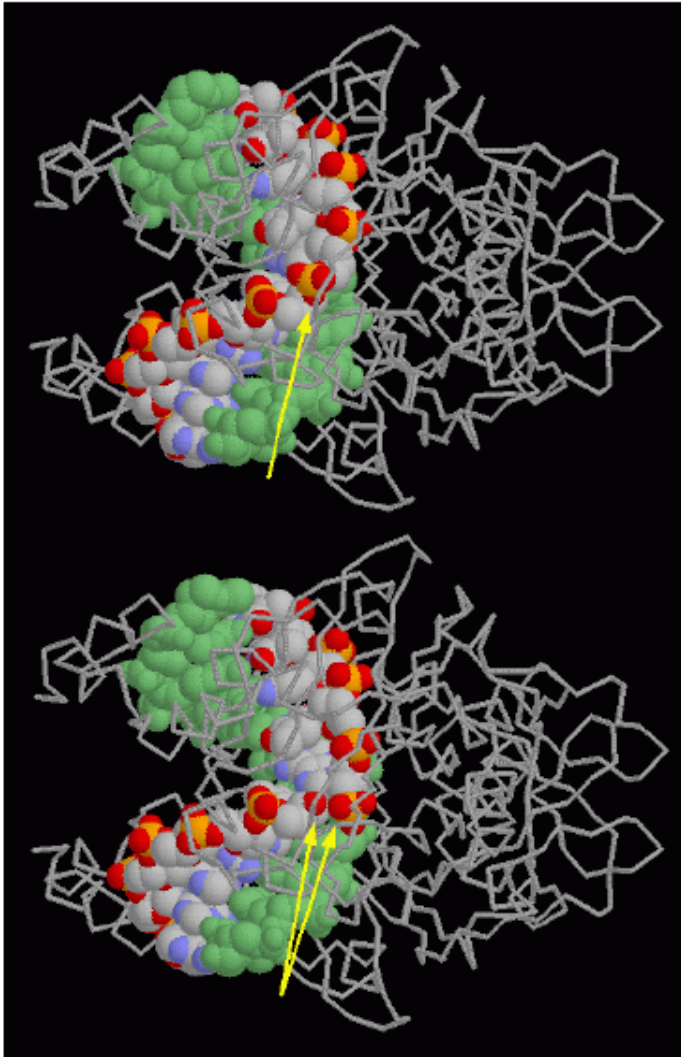
Enzimas de restrição

Nomenclatura

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



Estrutura de enzimas de restrição



<http://www.rcsb.org/3d-view/1AZ0/1>

Existem inúmeras enzimas de restrição

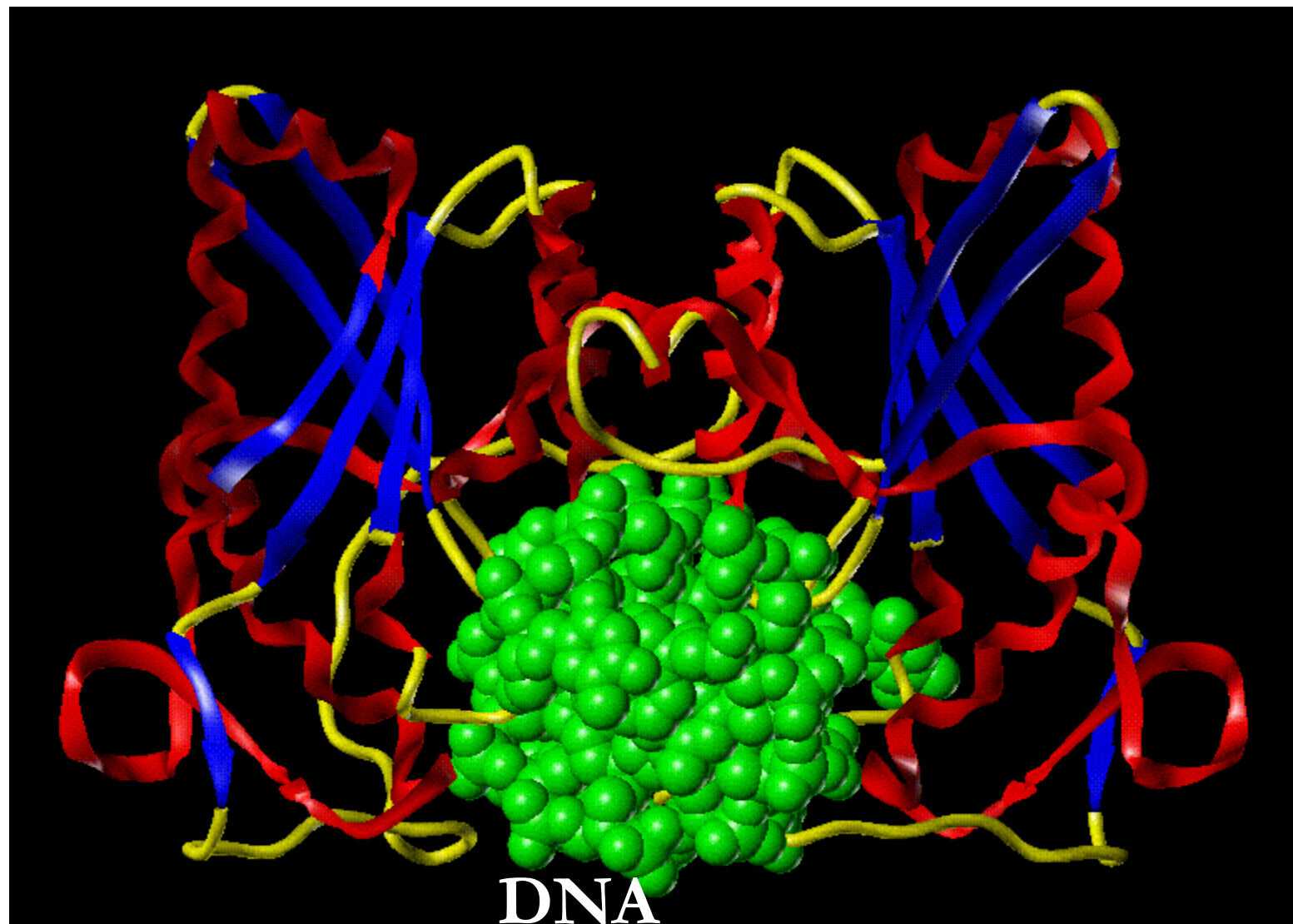
Microrganismo	Enzima	Sequência Alvo
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	<pre> G A A T T C C T T A A G ↑ ↓ </pre>
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	<i>BamHI</i>	<pre> G G A T C C C C T A G G ↑ ↓ </pre>
<i>Bacillus globigii</i>	<i>BglII</i>	<pre> A G A T C T T C T A G A ↑ ↓ </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeII</i>	<pre> Pu G C G C Pi Pz C G C G R ↓ ↓ </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>SaI</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 C C T ↑ ↓ </pre>
<i>Brevibacterium albidium</i>	<i>BaI</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) C T (T C C G) G A ↑ ↓ </pre>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	<pre> C C C G G G G G G C C C ↑ ↓ </pre>

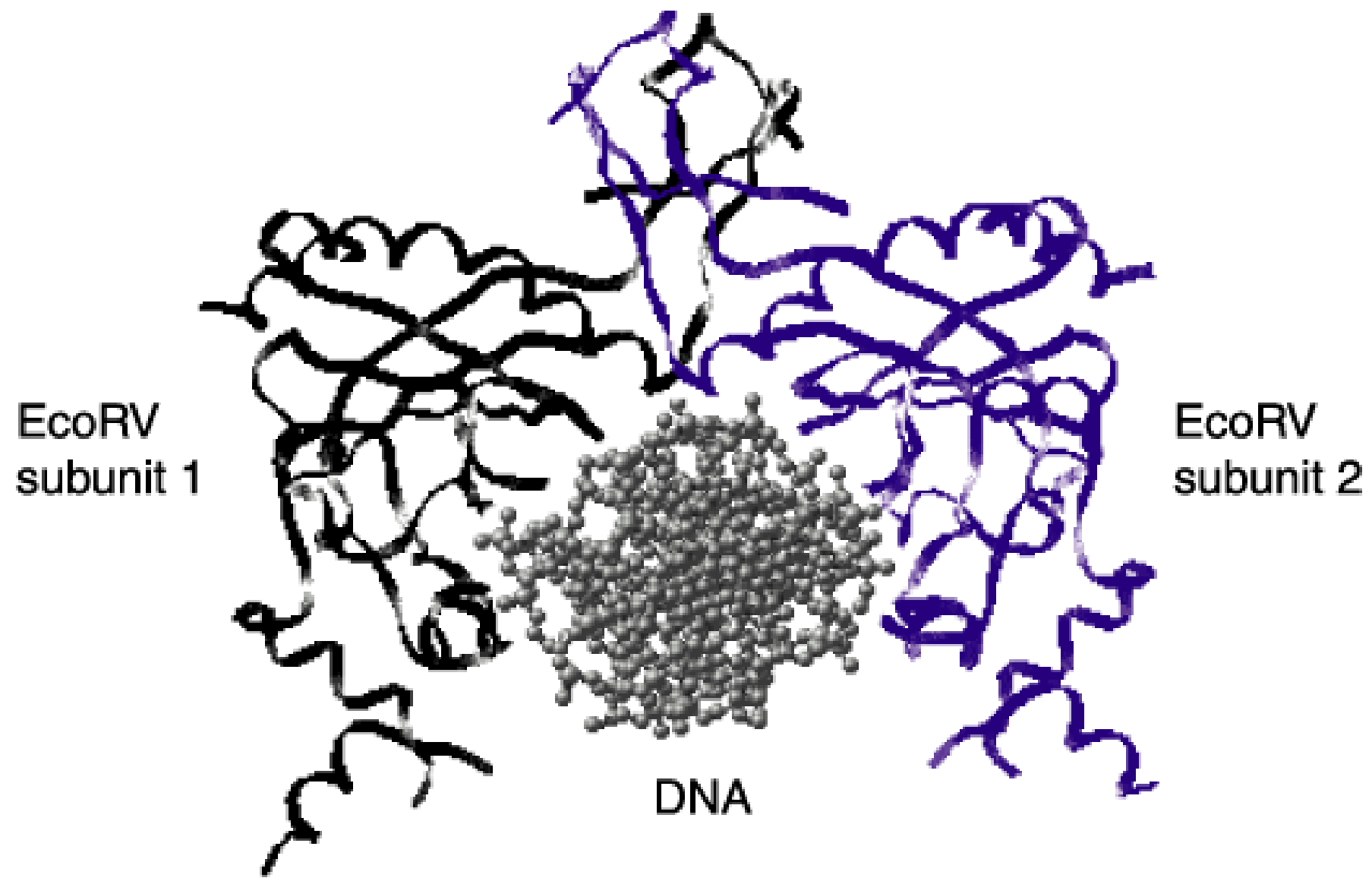
Banco de dados sobre enzimas de restrição

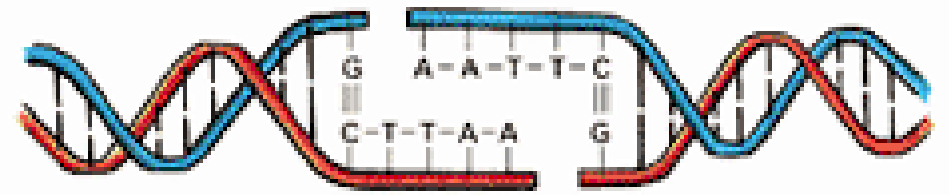
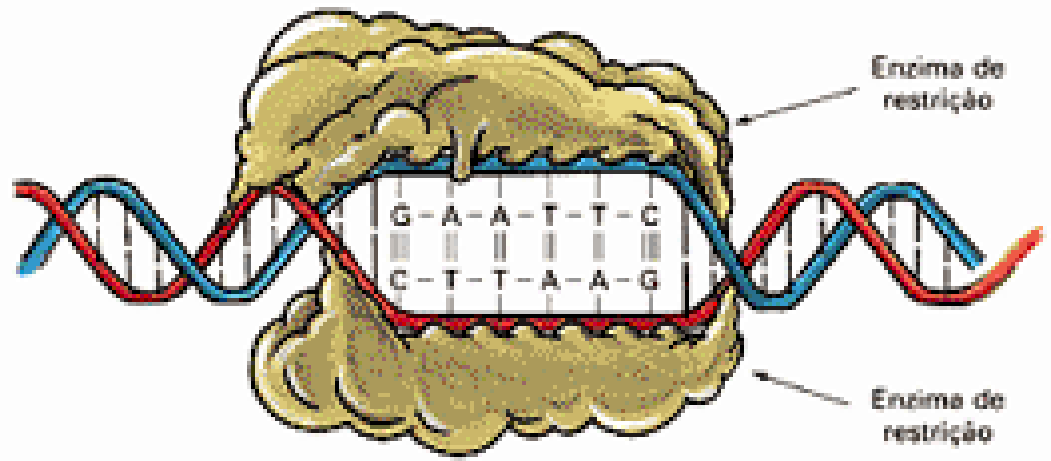
The image shows a screenshot of the REBASE website interface. At the top left is the REBASE logo, which consists of the word "REBASE" in blue letters with a registered trademark symbol, and a pair of scissors cutting through the letters. To the right of the logo is the text "REBASE^R The Restriction Enzyme Database" and the URL "http://rebase.neb.com - CITING REBASE...". Below this is a search section with a green background. It contains the text "Choose search category and enter keyword: use percent sign as wildcard and quotes around phrases". There are two search boxes: the first is labeled "author starting with" and has a dropdown arrow; the second is labeled "enzyme name or #:". Each search box has "Go" and "Clear" buttons. To the right of the search section are several icons for different database features: "REBASE Genomes" (a pie chart), "REBASE Tools" (a wrench), "REBASE search" (a magnifying glass), and "REBASE Suppliers" (dollar signs). Below the search section are more icons: "REBASE Submit Data" (a document), "REBASE PacBio" (the PacBio logo), "REBASE sequence data" (a document with a scissors icon), "REBASE Files" (a red folder), "REBASE HELP" (a question mark), "REBASE Services" (a blue house icon), "REBASE Related Sites" (a blue button), "REBASE NEWS" (a newspaper icon), "REBASE References" (a book icon), "REBASE Lists" (a document icon), "REBASE Enzymes" (a black box with white text), "REBASE Crystal Data" (a molecular structure), "REBASE METHYLATION SENSITIVITY" (a green oval with "CH₃? CH₃"), and "Dr. Richard J. Roberts and Dana Macaluso" (a yellow box).

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

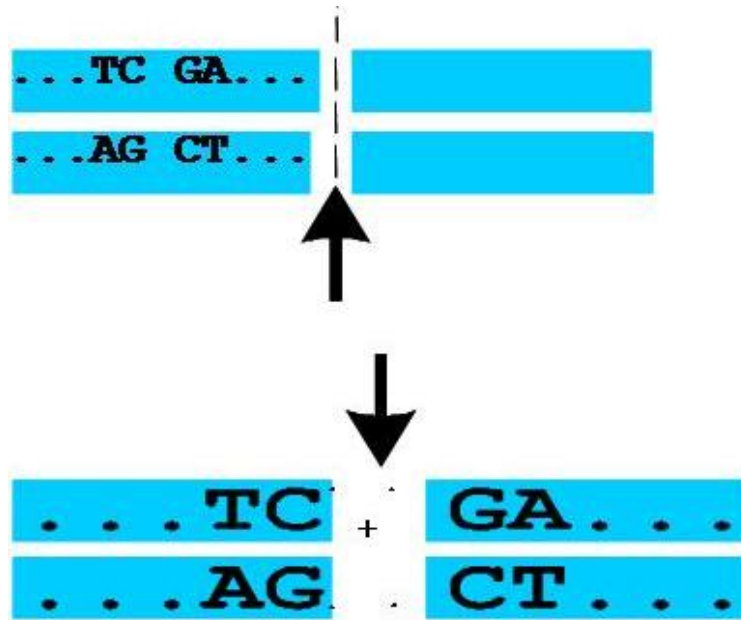
*Bam*HI



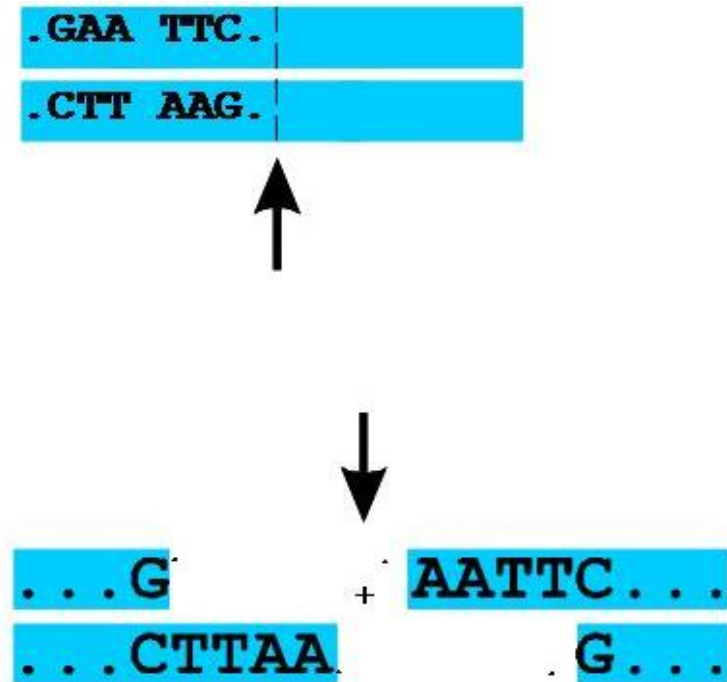




Tipos de Cortes



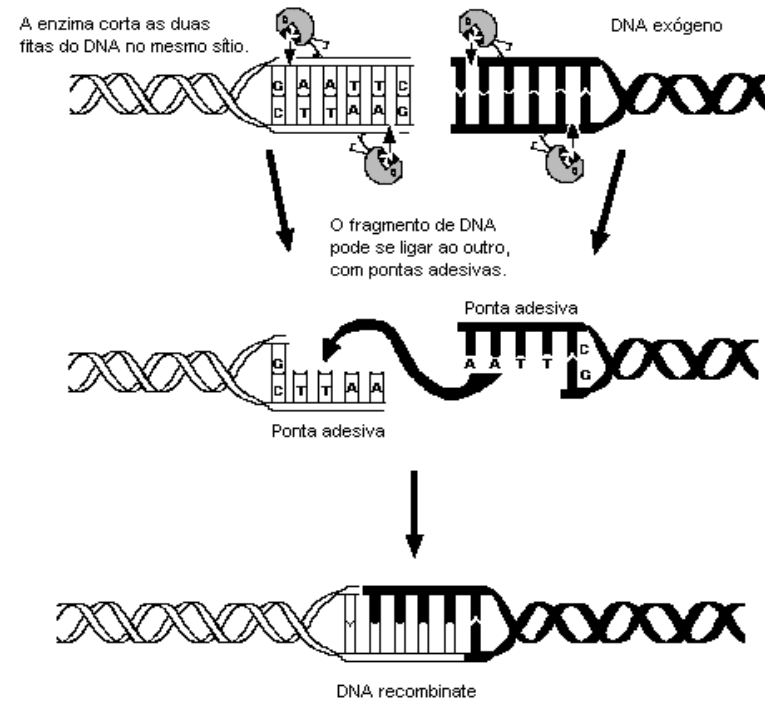
Moléculas com extremidades cegas



Moléculas com extremidades coesivas

E assim se recombina DNA...

Enzima de Restrição
Ação da EcoR1



Mas como ele é mantido e multiplicado???

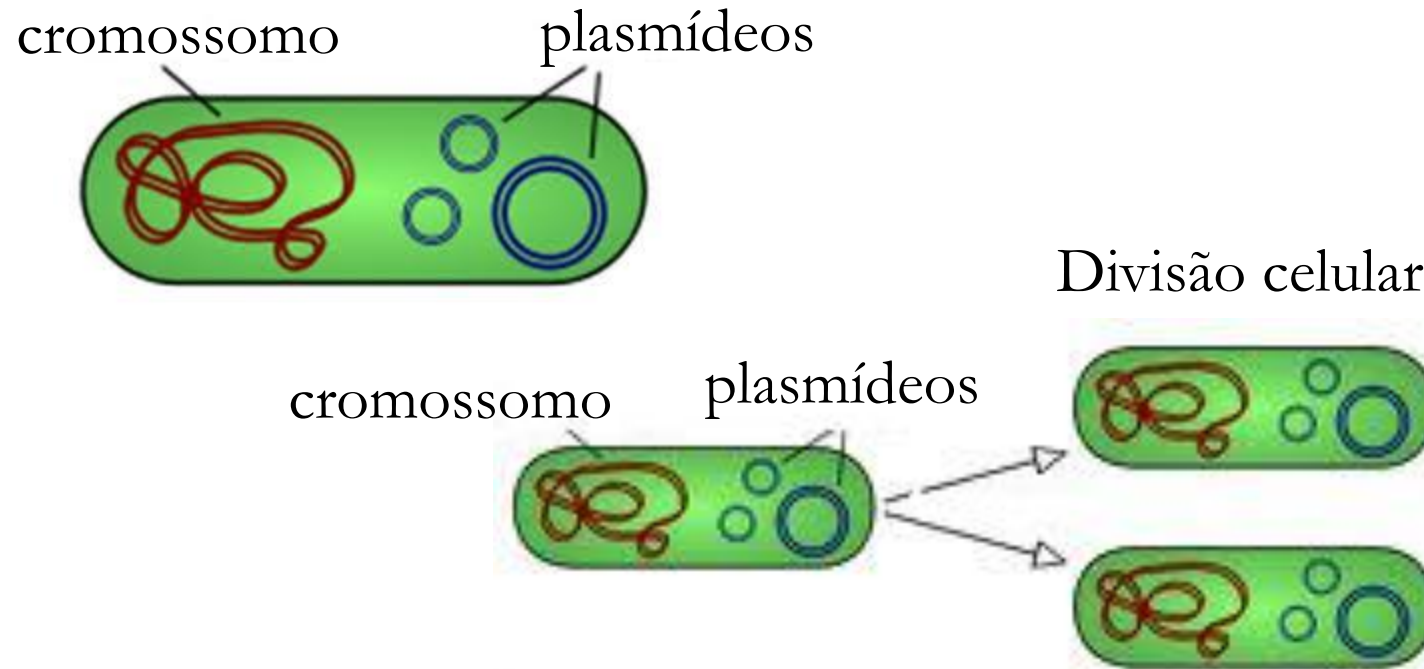
Vetores de clonagem

Um vetor de clonagem é uma molécula **accessória** de DNA com capacidade de **autoreplicação** em um **hospedeiro**, e que irá conter o fragmento de DNA alvo

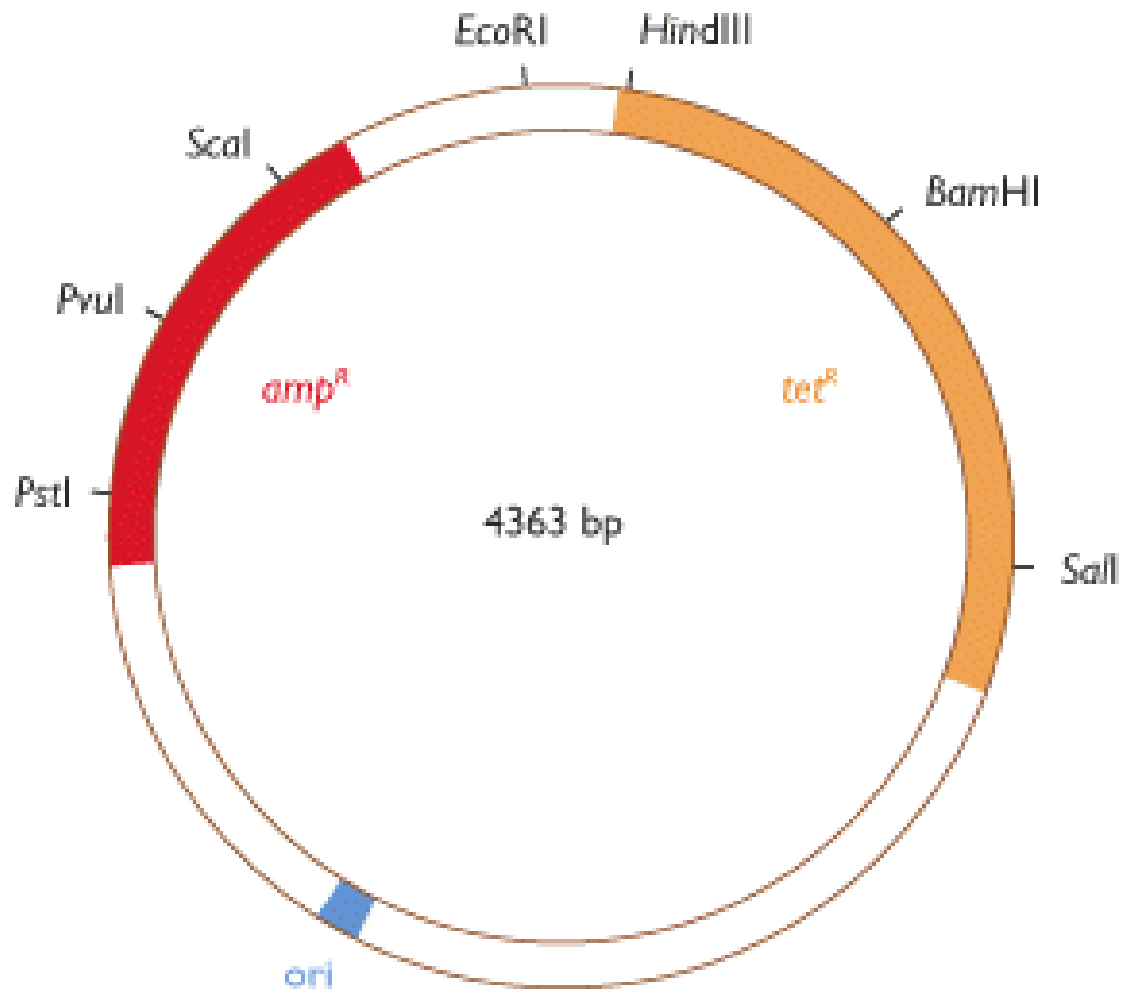
Tipos de vetores para clonagem podem ser usados, dependendo do **tamanho do inserto**:

- **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)

Plasmídeos como vetores de clonagem



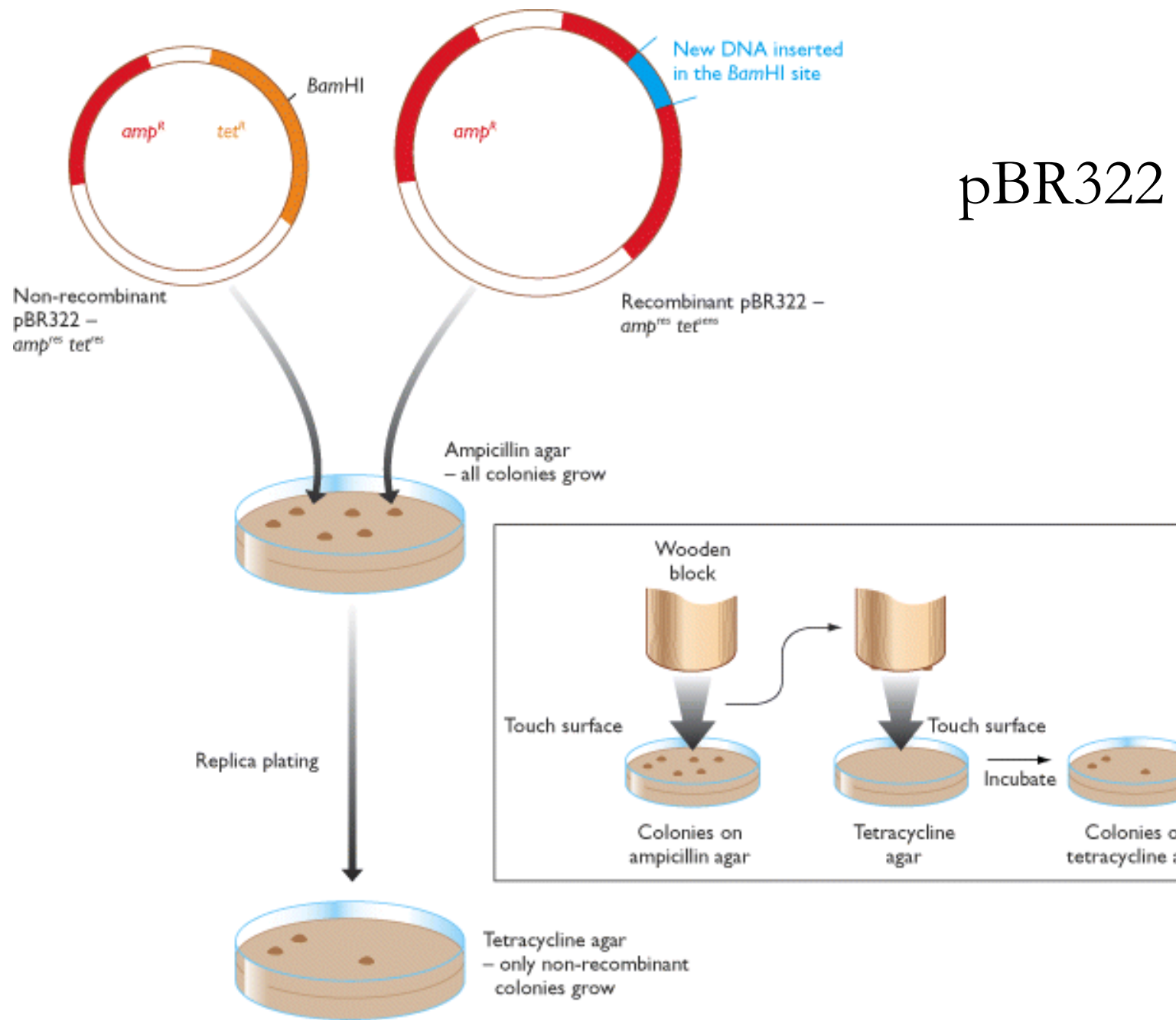
- ✓ ocorrem naturalmente em algumas bactérias
- ✓ são moléculas de DNA dupla fita e circular
- ✓ muitas vezes carregam genes para resistência a antibióticos
- ✓ replicação independente da replicação cromossômica (apresentam uma origem de replicação independente)



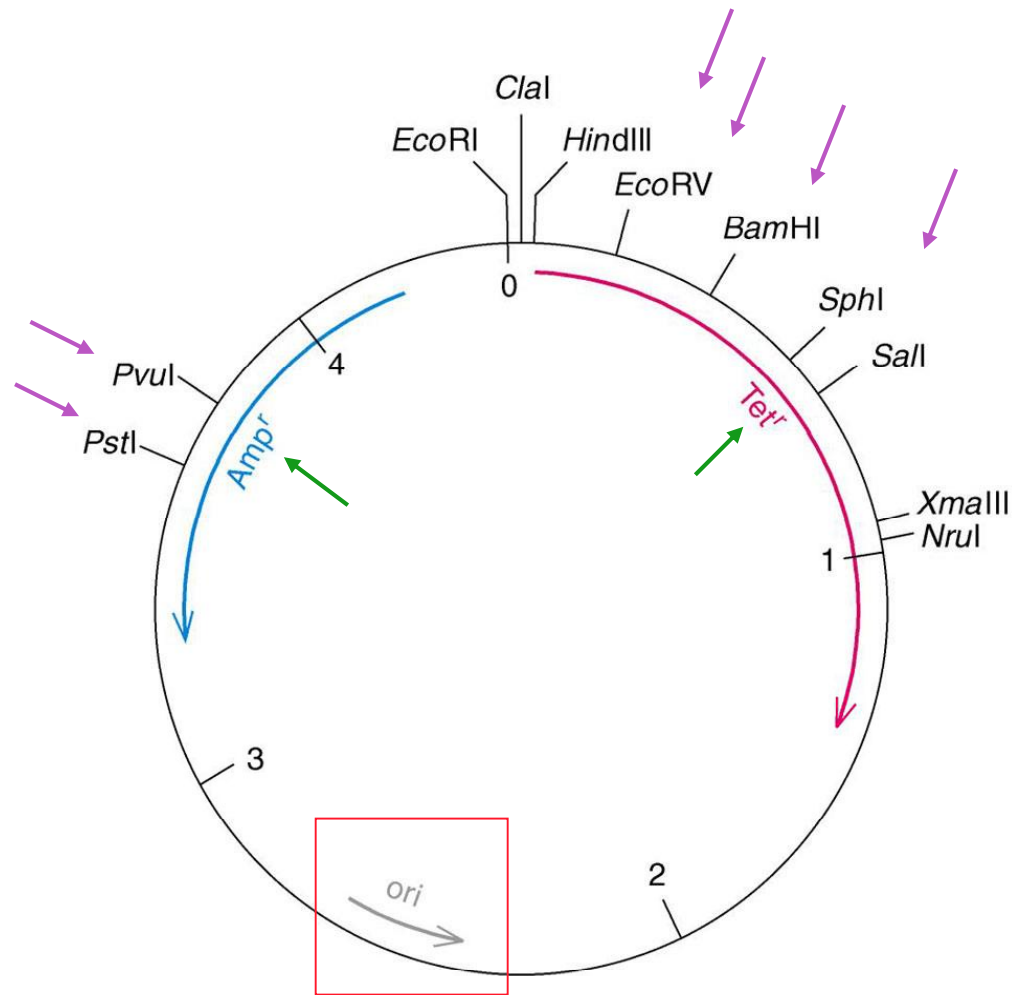
pBR322

1° plasmídeo -1977

Bolivar et al., 1977



Vetores: principais características

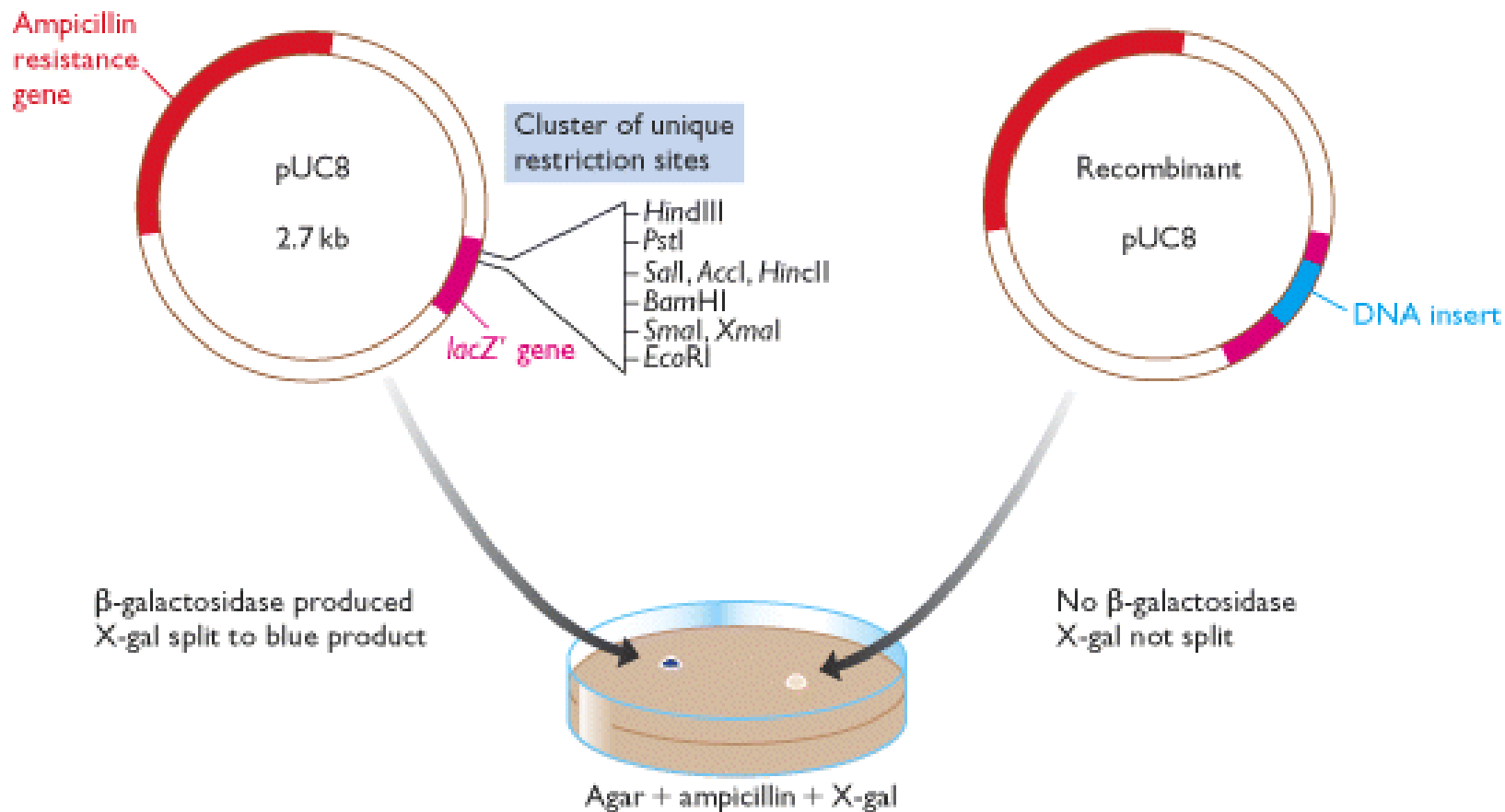


- **Origem de replicação**
↓
Permite a autoreplicação, independente do cromossomo
- **Genes de seleção (resistência a antibióticos)**
↓
Permite que a célula hospedeira cresça em meio seletivo
- **Múltiplos sítios de clonagem**
↓
Permite a inserção de DNA exógeno com flexibilidade de escolha das enzimas

pUC8

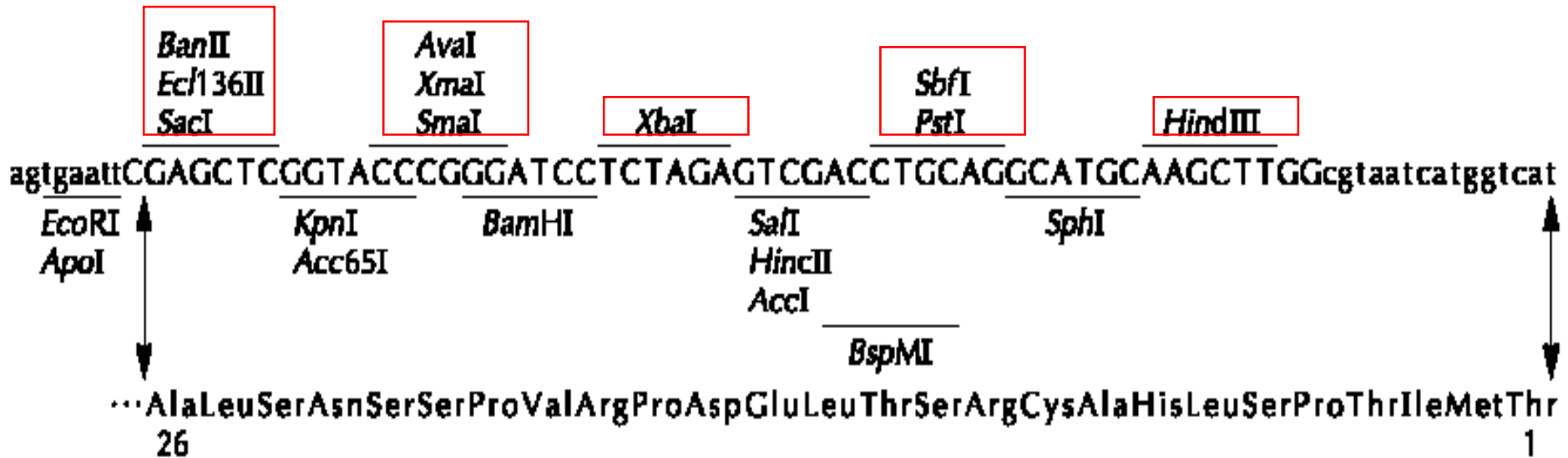
1982

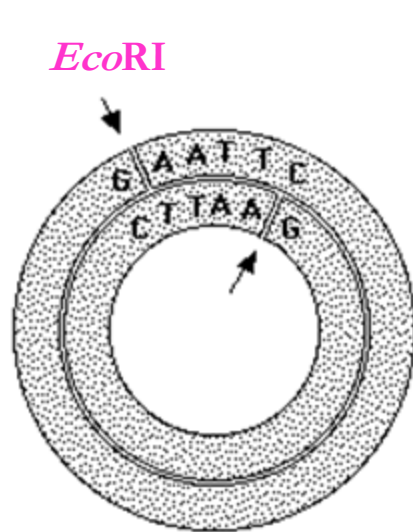
Vieira & Messing



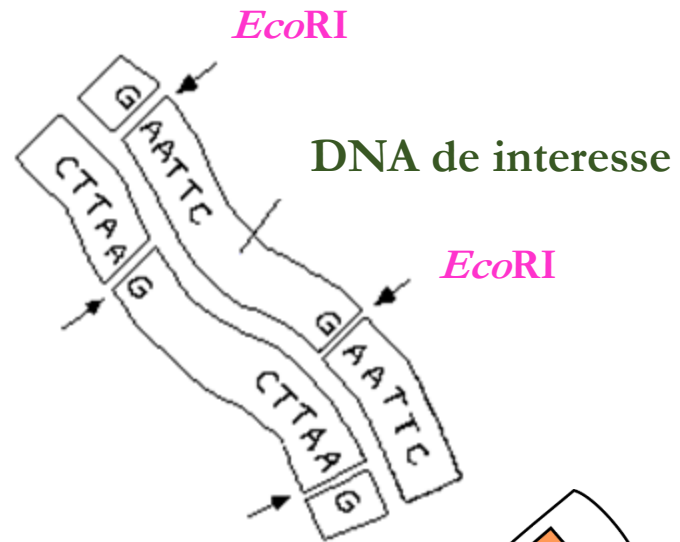
Vetores de Clonagem

Poli-linker (sítio múltiplo de clonagem - MCS)





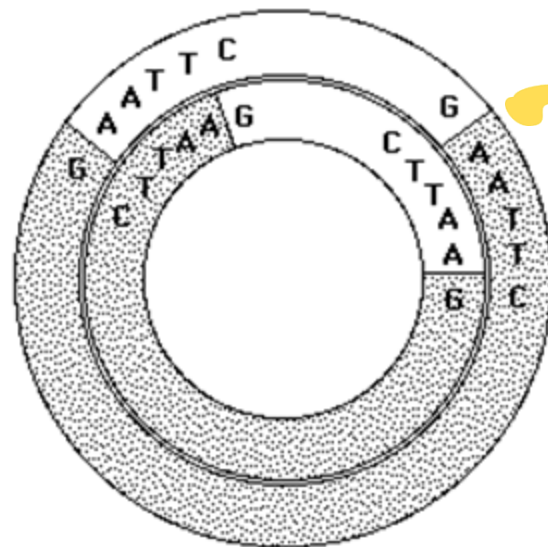
Plasmídeo



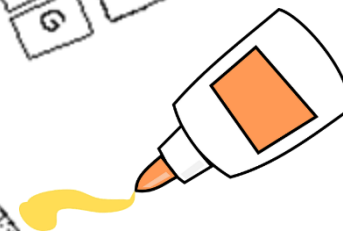
DNA de interesse

Extremidades coesivas

Ligação

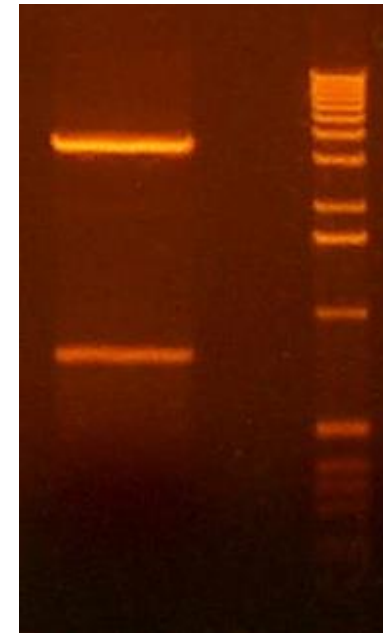
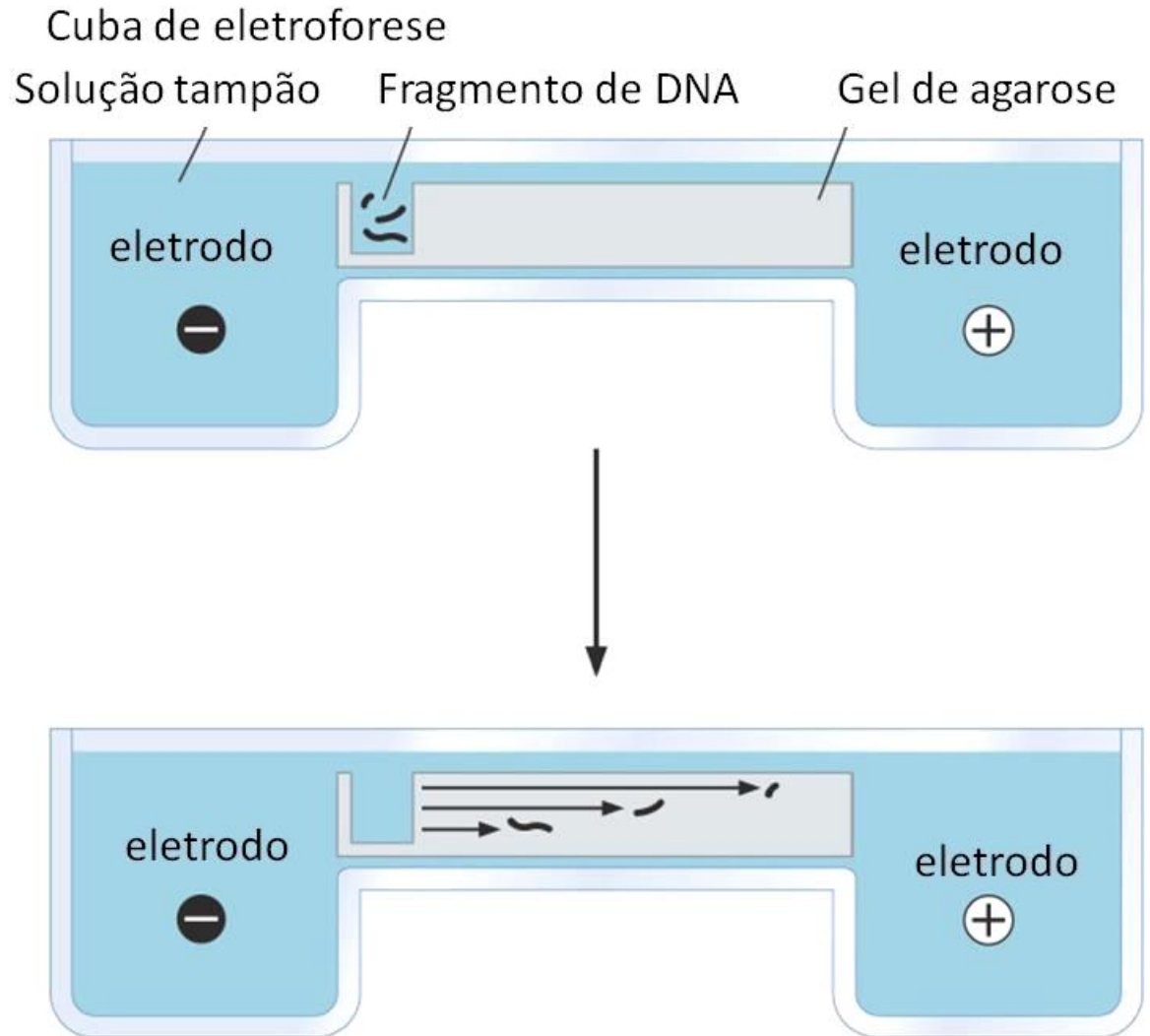


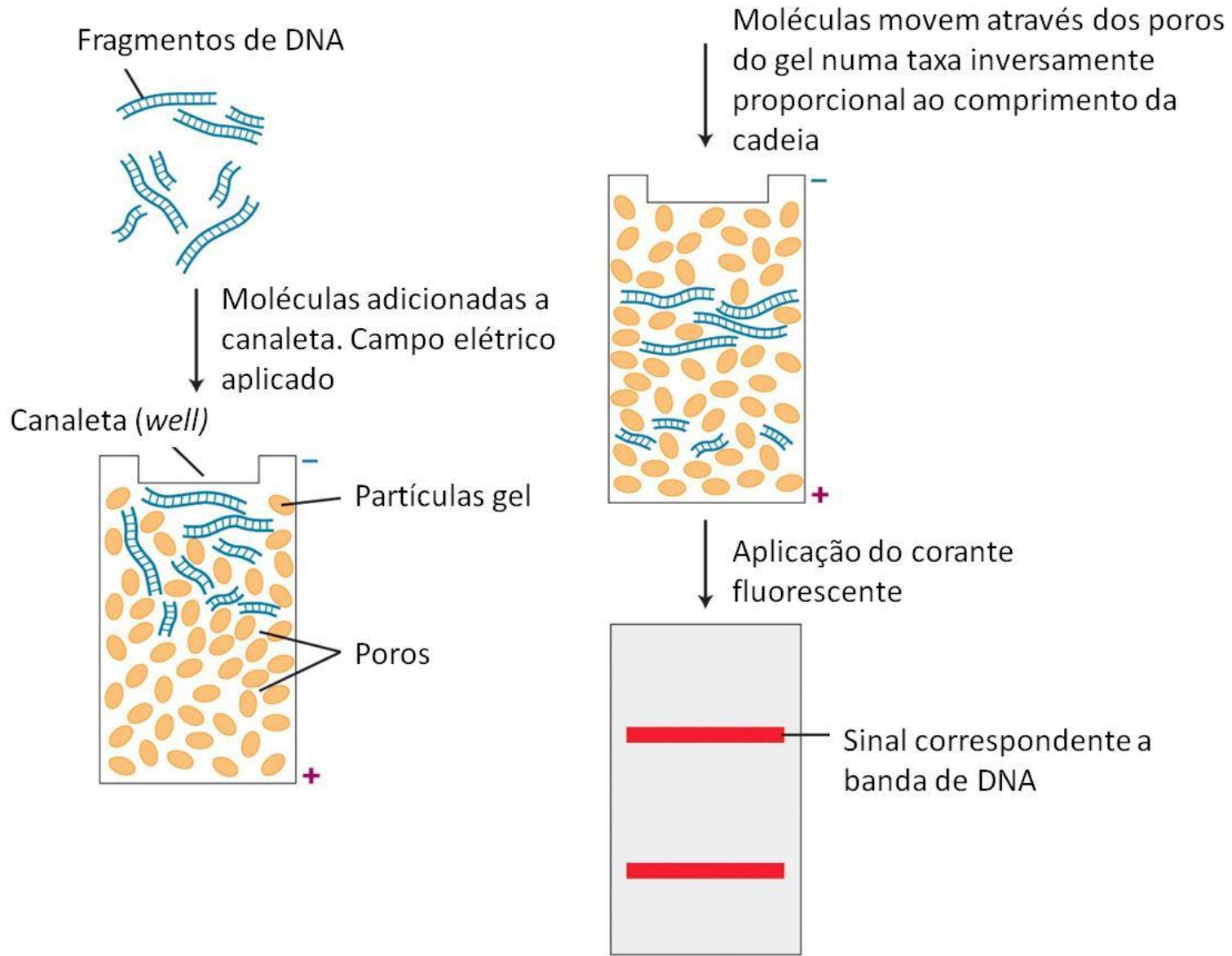
DNA recombinante



DNA ligase

Eletroforese





DNA Genômico é diferente

Milhares ou bilhões de pares de bases...

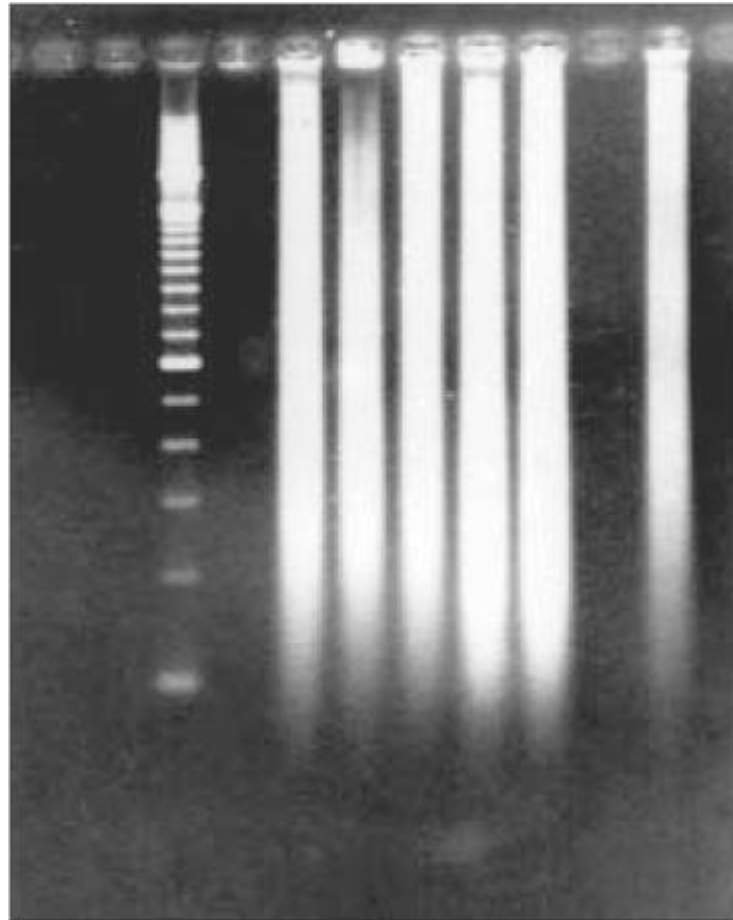


Figura 1 – Amostras de DNA total, extraídas de fragmentos de leiomiomas uterinos embebidos em parafina e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%

Cortando genoma humano
com 3.000.000.000 pb
com *EcoRI*, quantos fragmentos
são esperados?????

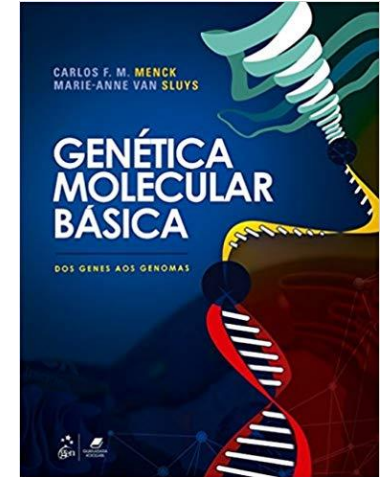
Estudo dirigido

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

Leitura

Capítulo 11 – Manipulando o gene /Técnicas de Biologia Molecular (páginas 197 a 241) . Menck, C.F.M.; Van Sluys, M.A. **Genética Molecular Básica: dos genes aos genomas. Editora Guanabara Koogan, 2017.**

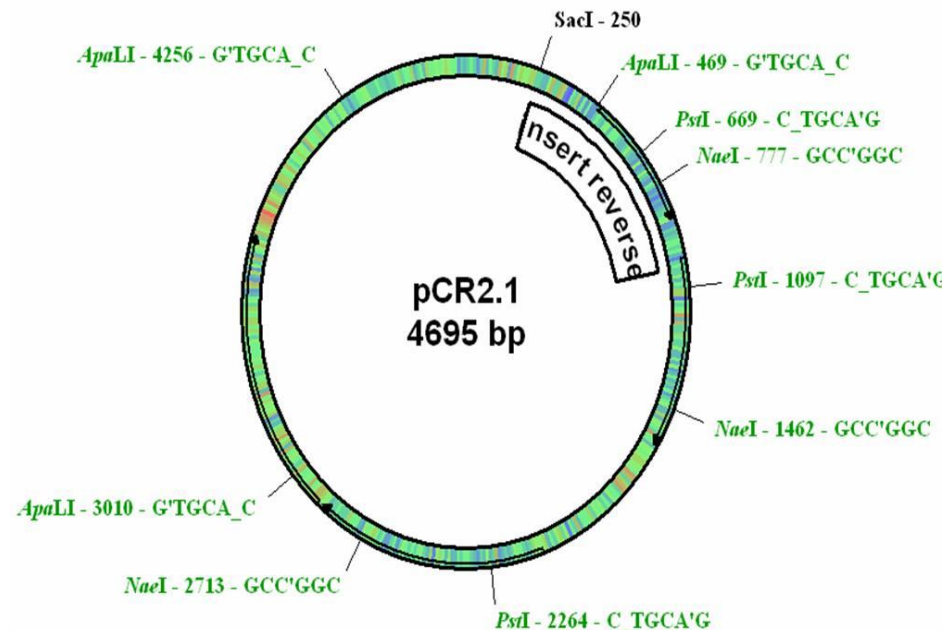
Capítulo 5 - Técnicas de Genética Molecular (páginas 171-222). Lodish et al. **Biologia Celular e Molecular.** 7o Edição. Editora Artmed, 2014.



Quiz 2

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

- O que são enzimas de restrição? Dê 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 plasmídeo pCR2.1, com as enzimas *Pst*I, *Nae*I, *Apa*LI e *Sac*I, destacando o tamanho de cada fragmento gerado.



A schematic representation of a gel electrophoresis apparatus, consisting of a rectangular frame with four lanes at the top, each containing a small rectangular well for loading DNA samples.