

REFLECTIONS

Succeeding in Science: Some Rules of Thumb*

by J.D. Watson

Publicado na Science 261: 1812-1813 (1993)

**Comemoração aos 40 anos da publicação
da dupla hélice do DNA**

Método simples e prático de ter sucesso em Ciência

- **Aprenda com os vencedores**
- **Se Arrisque**
- **Tenha um refúgio ou apoio**
- **Trabalhe em algo que voce goste**
- **Mantenha-se conectado com o mundo científico**

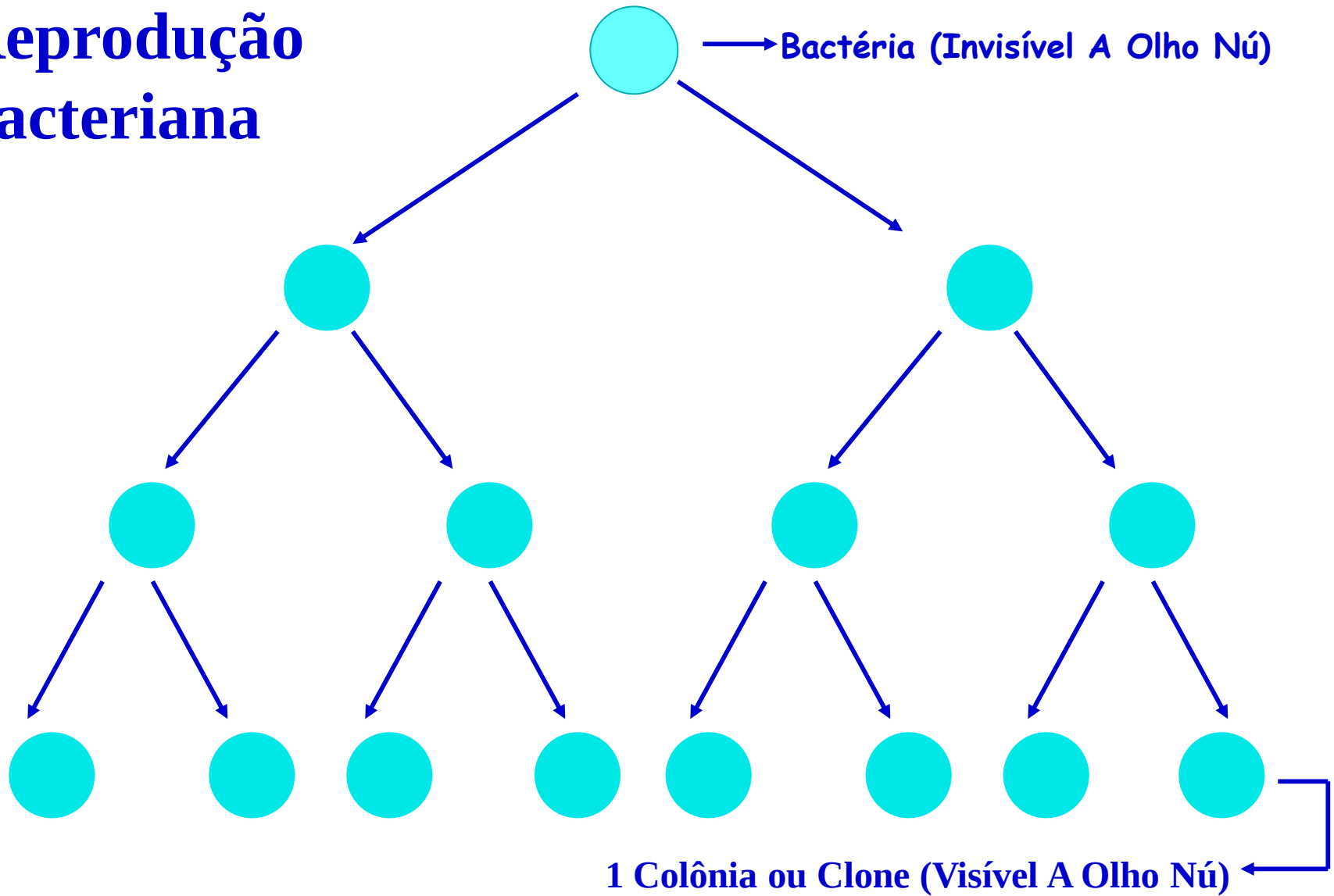
Bactérias em Genética Molecular

Características das bactérias

1. Tempo de geração:

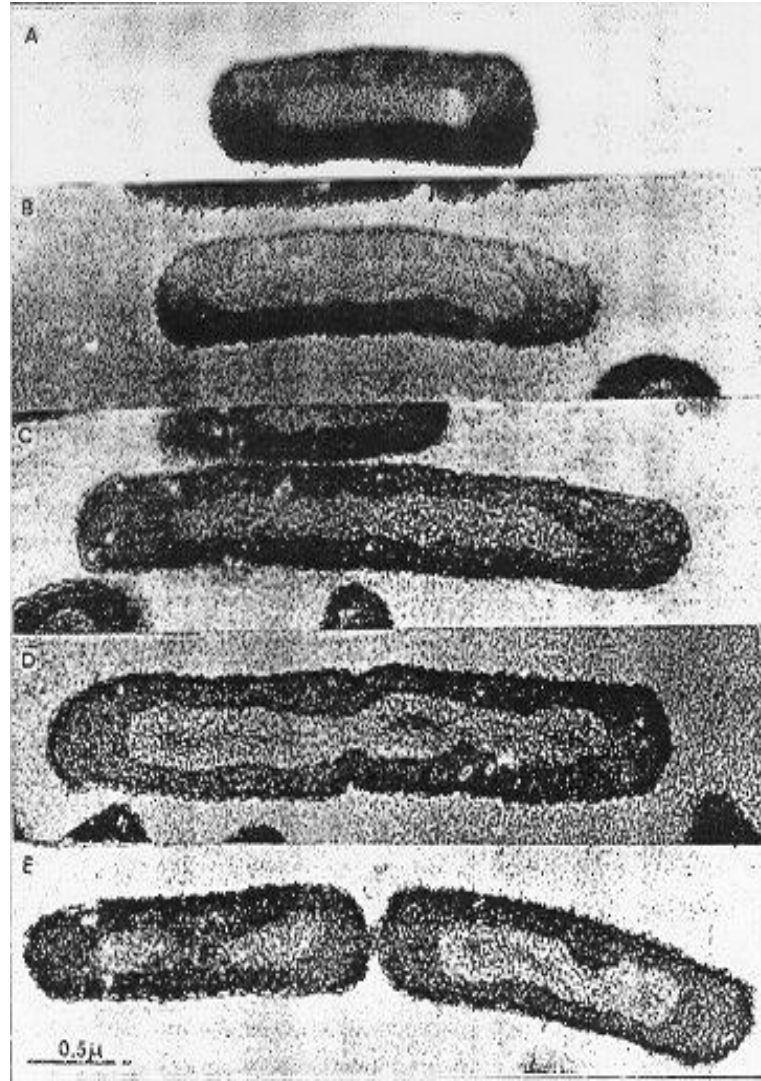
Homem	→	20 anos
<i>Drosophila</i>	→	15 dias
<i>E.coli</i>	→	20 min
2. N° de indivíduos isolados:
→ 1ml 10^9 bactérias
→ 10ml 10 bilhões
3. Conservação: congelamento
4. Meios de cultivos definidos e seletivos
5. Pode aceitar plasmídios e bacteriófagos

Reprodução bacteriana



Clonagem: Amplificação de um gene de interesse

Reprodução bacteriana



Vetores para Clonagem Molecular

Plasmídios – 0-10 Kb

Bacteriófagos λ : inserção 0-10 Kb

substituição 9-23 Kb

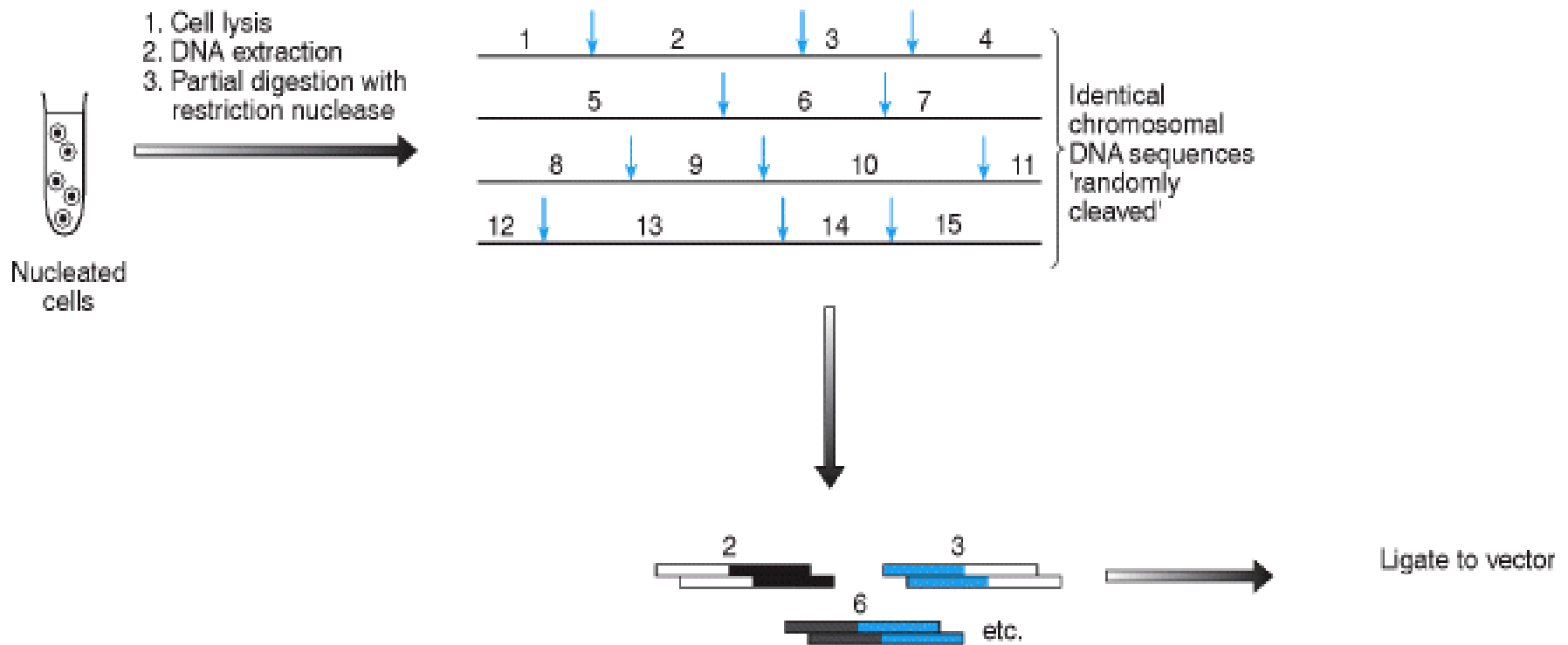
Cosmídios (plasmídio + bacteriófago) 30-44 Kb

Cromoss.artificial de levedura (YAC) 0,2-2 MB

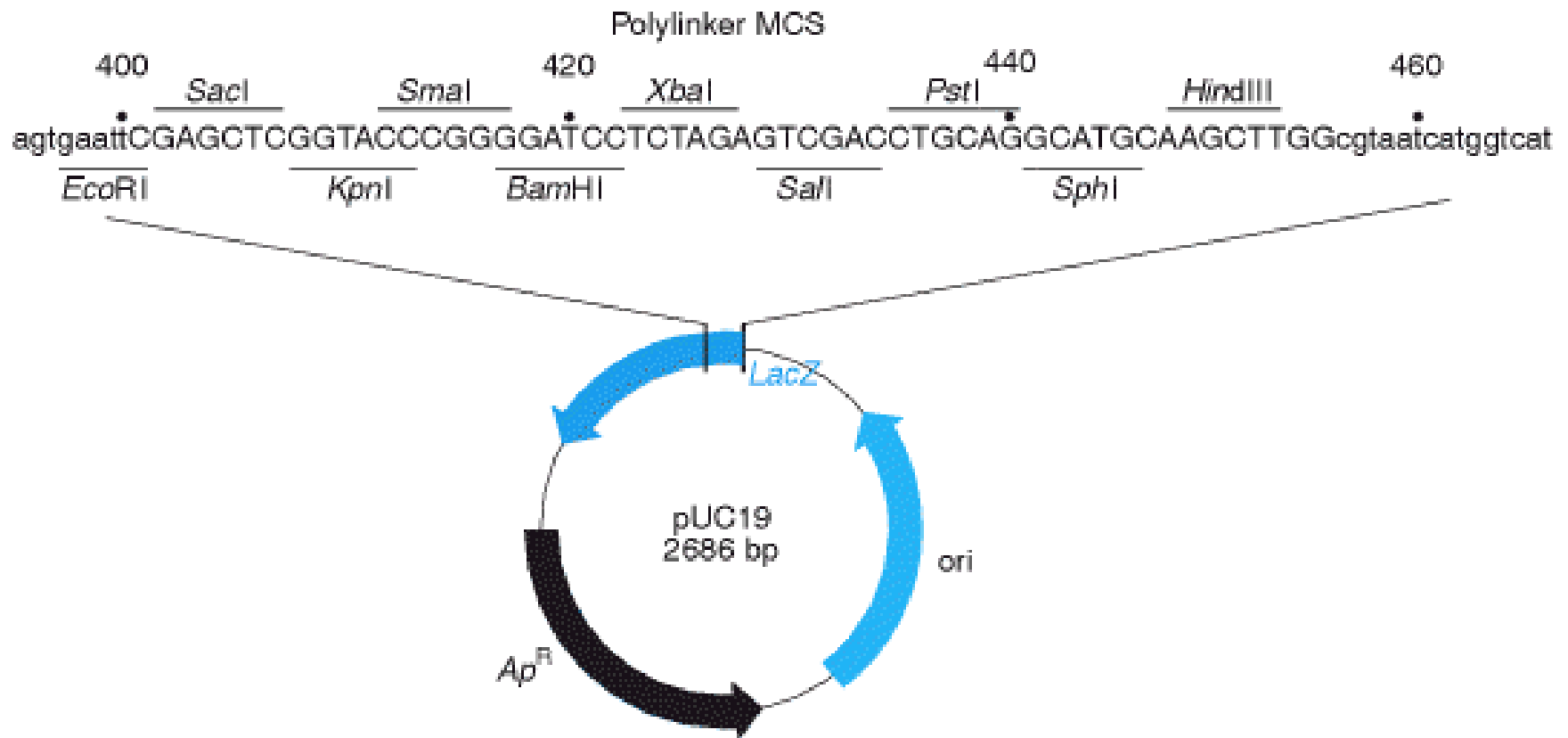
Enzimas de restrição e seus sítios de clivagem

MICROORGANISM	ENZYME ABBREVIATION	SEQUENCE
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HbaI</i>	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' ... G A A G A (N) ₈ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₇ ... 5'
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'
	<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'
<i>Providencia stuarti</i>	<i>PstI</i>	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'
<i>Microcoleus</i>	<i>MstII</i>	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G G A N T C C ... 5'
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	<i>NotI</i>	5' ... G C G G C C G C ... 3' 3' ... C G C C G G C G ... 5'

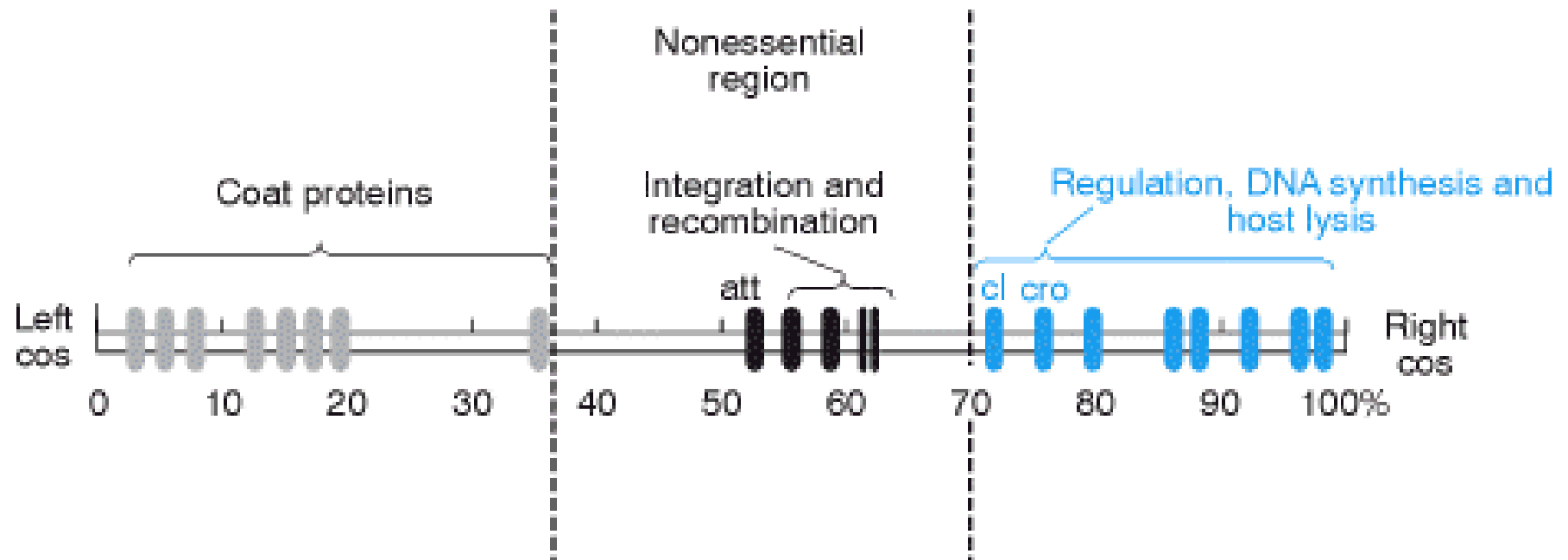
Clivagem parcial para a construção da biblioteca de DNA genômico a ser clonado



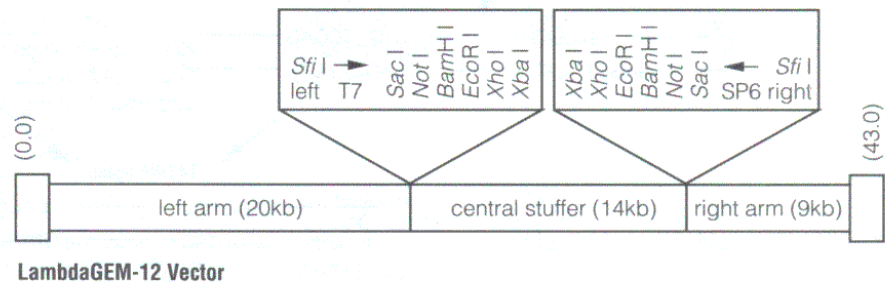
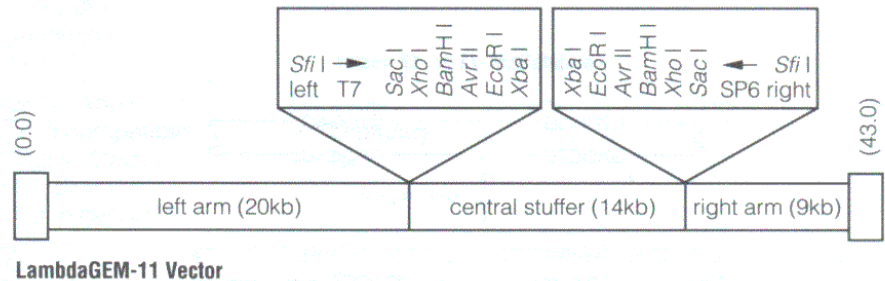
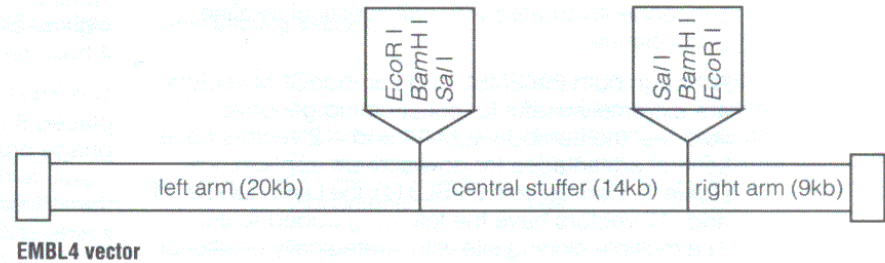
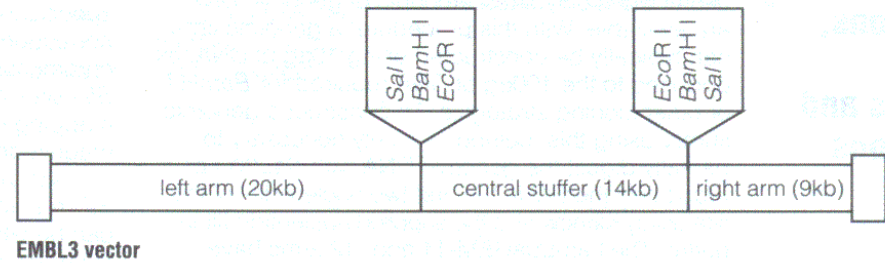
Mapa do plasmídeo pUC19



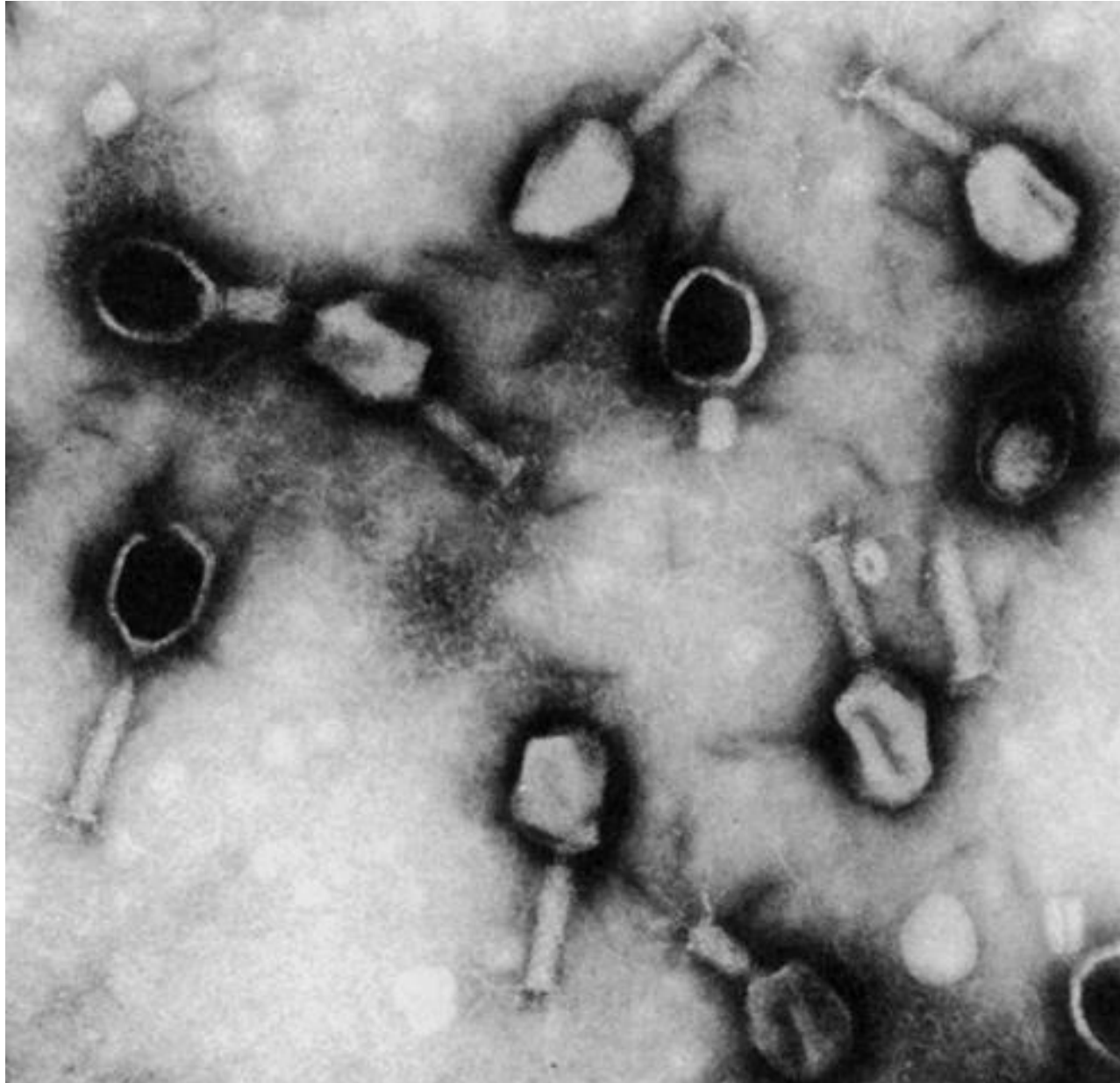
Mapa do genoma do fago λ mostrando o sítio para clonagem



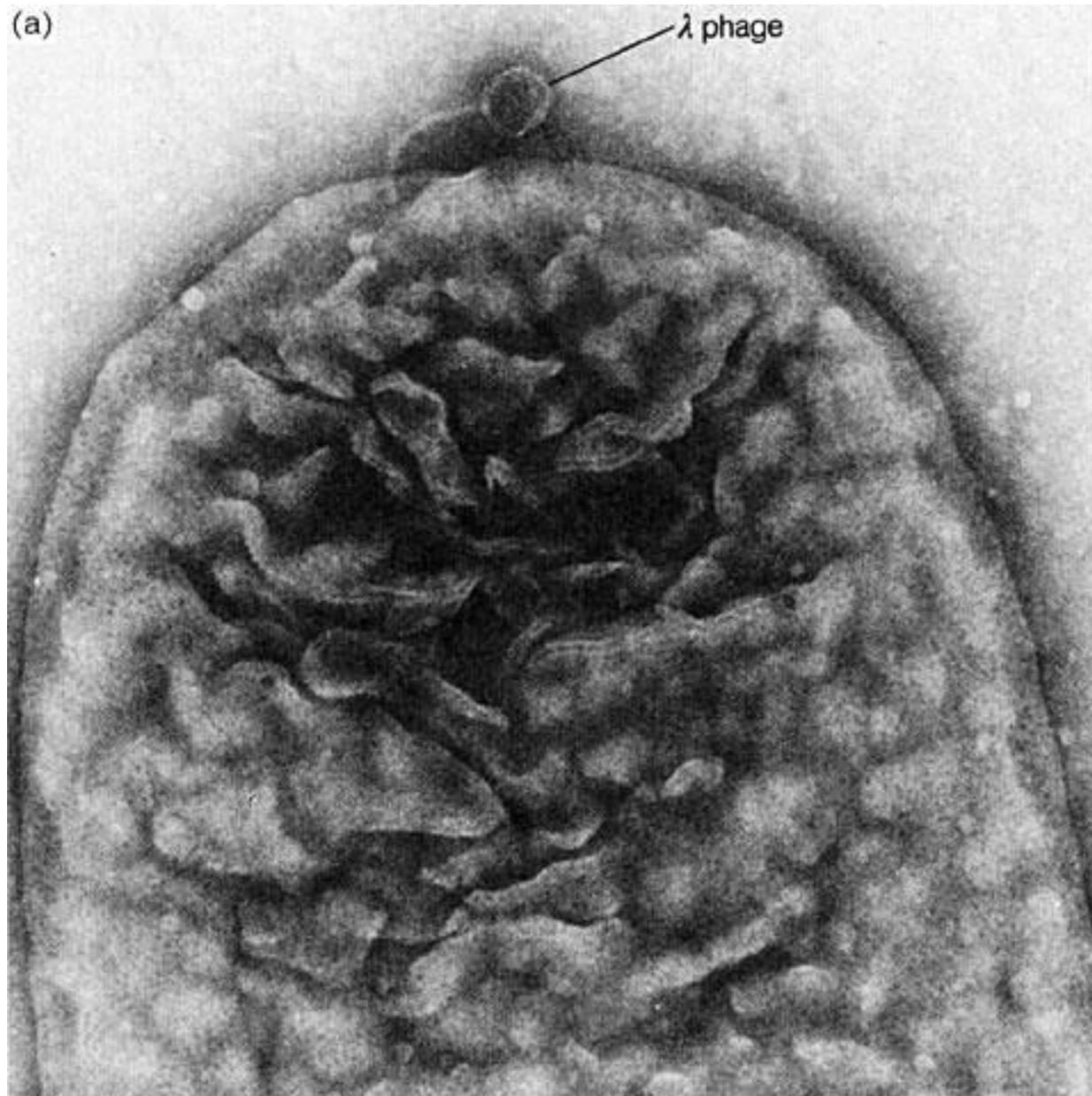
Esquema do genoma de alguns fagos



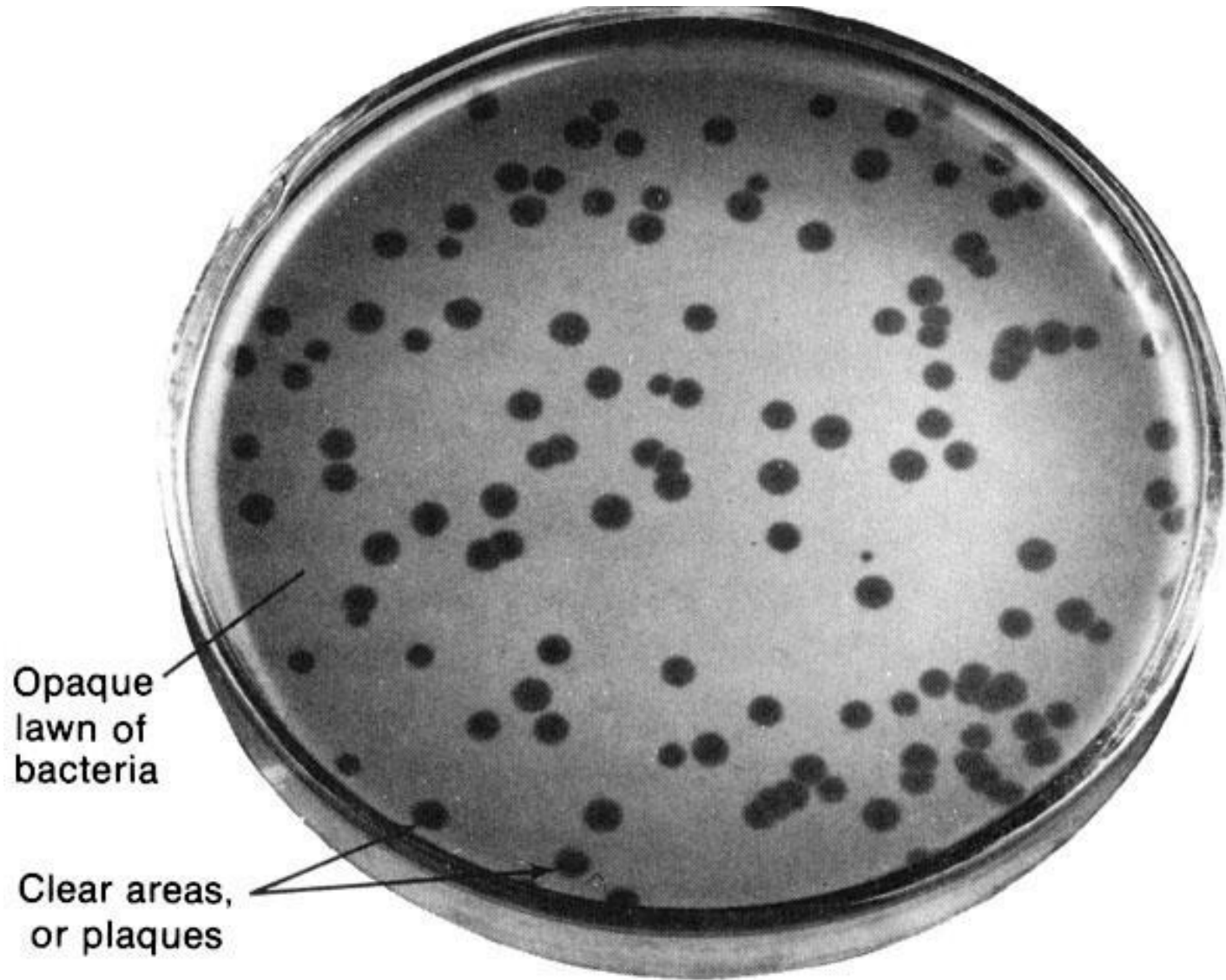
Bacteriófagos λ



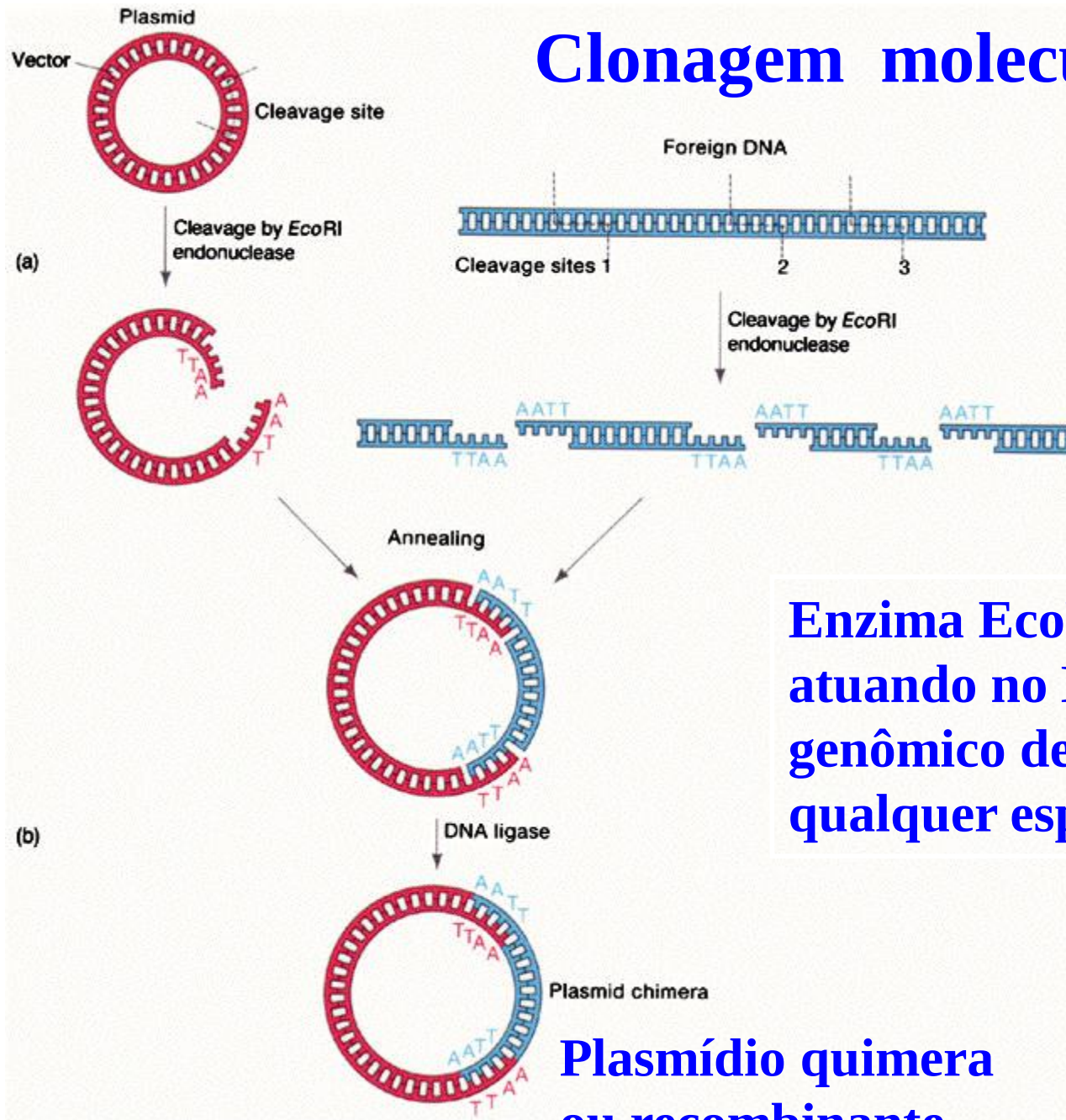
Infecção de bactéria por fago λ



Placas de lise: cada bacteriófago dá origem a uma placa de lise



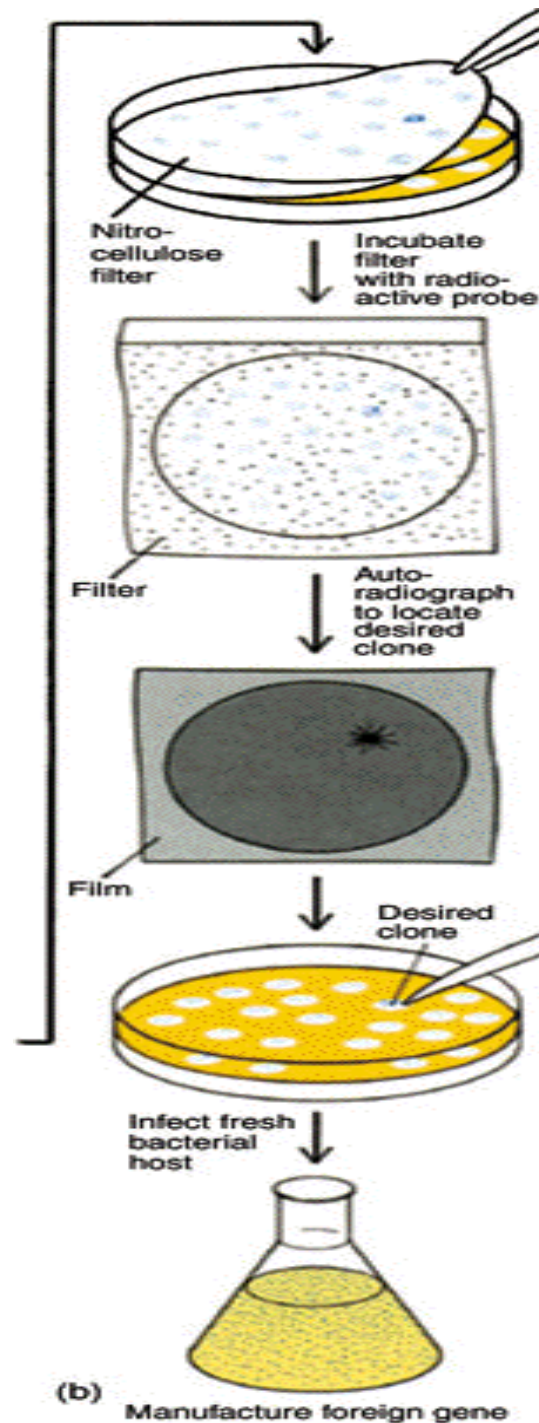
Clonagem molecular



Enzima *Eco*RI
atuando no DNA
genômico de
qualquer espécie

Plasmídio quimera
ou recombinante

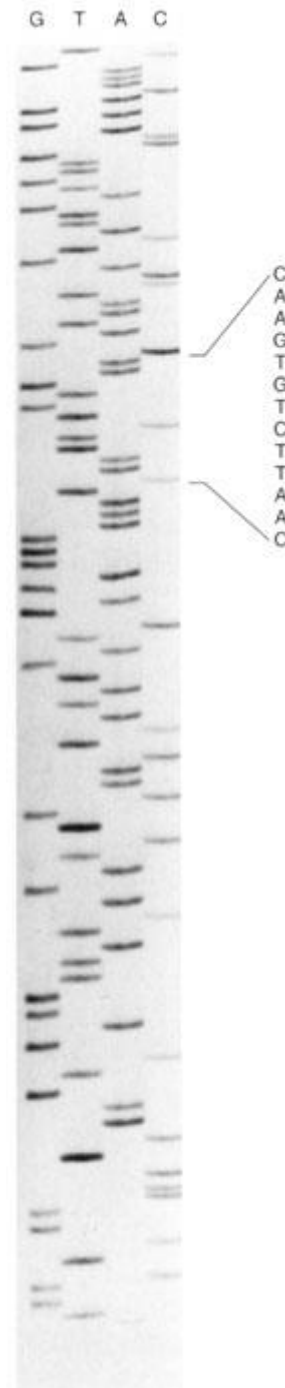
Hibridação com sonda molecular



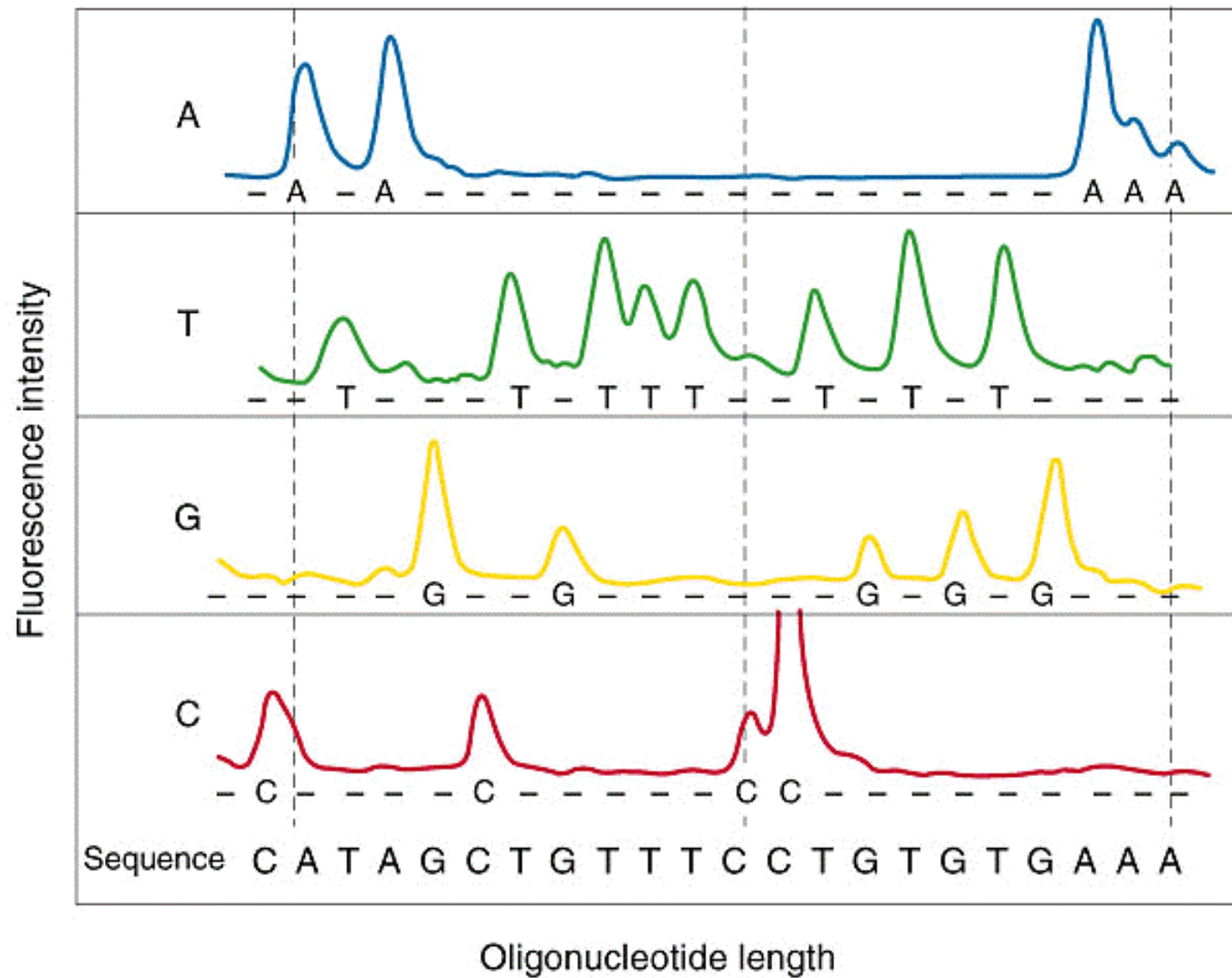
Sonda radioativa



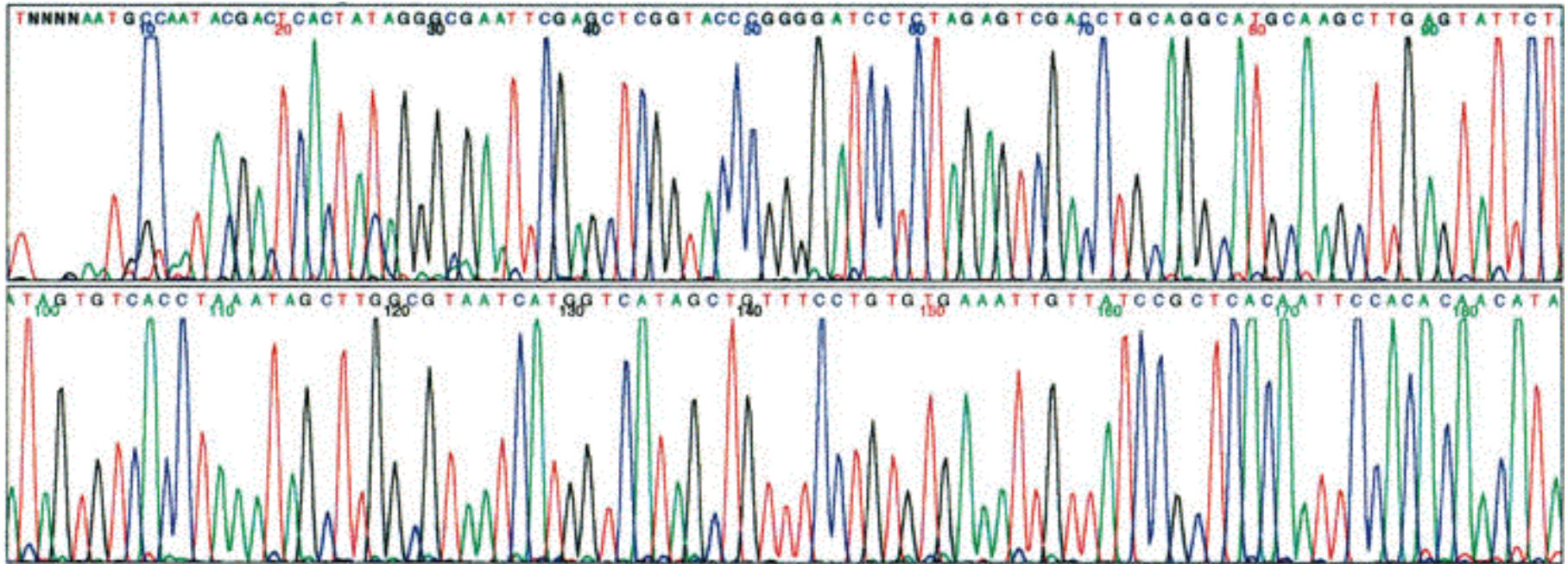
Gel de sequenciamento Sanger 1977



Sequenciamento automático



Sequenciamento automático de DNA



Sistemas de Modificação e Restrição

Sistema de Restrição-Modificação

**ocorre em muitas espécies bacterianas e
se constitui num mecanismo de defesa
contra a introdução de DNA exógeno na
célula**

Sistema de Restrição-Modificação

- 1. Endonucleases de restrição (restrição)**
- 2. Metilase: Adiciona grupos metil às bases a C ou A dentro da sequência de reconhecimento das enzimas de restrição; DNA do hospedeiro se torna resistente à enzima (Modificação)**

Enzimas do sistema de Restrição e Modificação

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Estrutura Protéica	Enzima bifuncional com 3 subunidades	Endonuclease e metilase separadas	Enzima bifuncional com 2 subunidades
Sítio de reconhecimento	Bipartite e assimétrico	sequência de 4-6 pb geralmente palindrômica	5-7 bp sequência assimétrica
Sítio de clivagem	Não específica. >1000 pb do sítio de reconhecimento	No próprio ou muito próximo do sítio de reconhecimento	24-26 pb downstream ao sítio de reconhecimento
Atividade de restrição e metilação	Reações mutuamente exclusivas	Reações independentes	Reações simultâneas
Utilidade para Biologia Molecular	Não. Clivagem não específica	Sim	Não. Reações de restrição e metilação simultâneas.

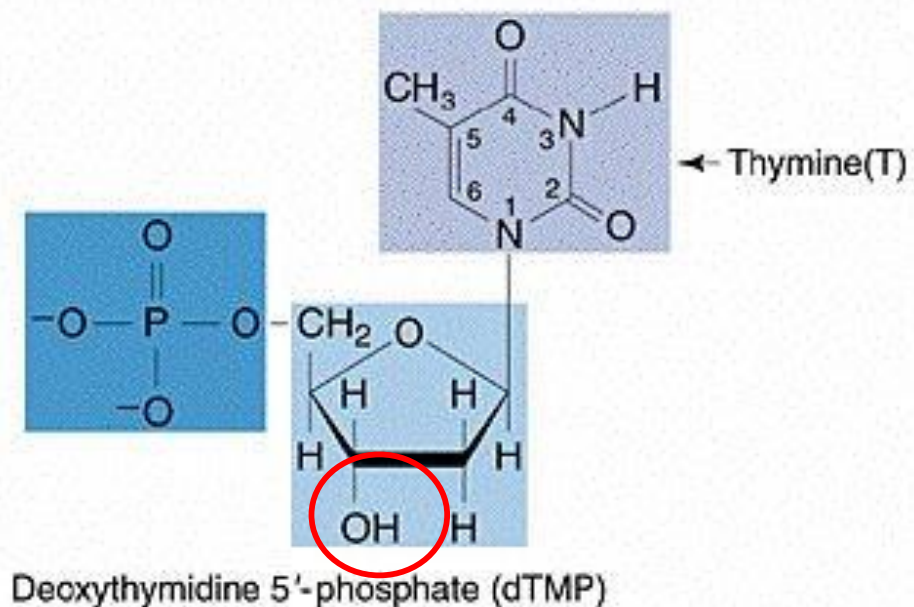
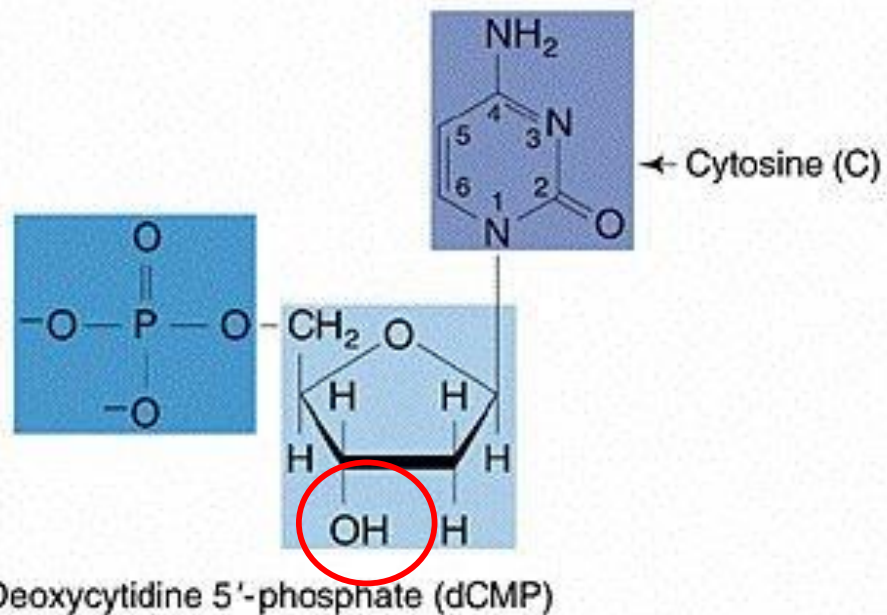
RGM 5862 Genética Molecular

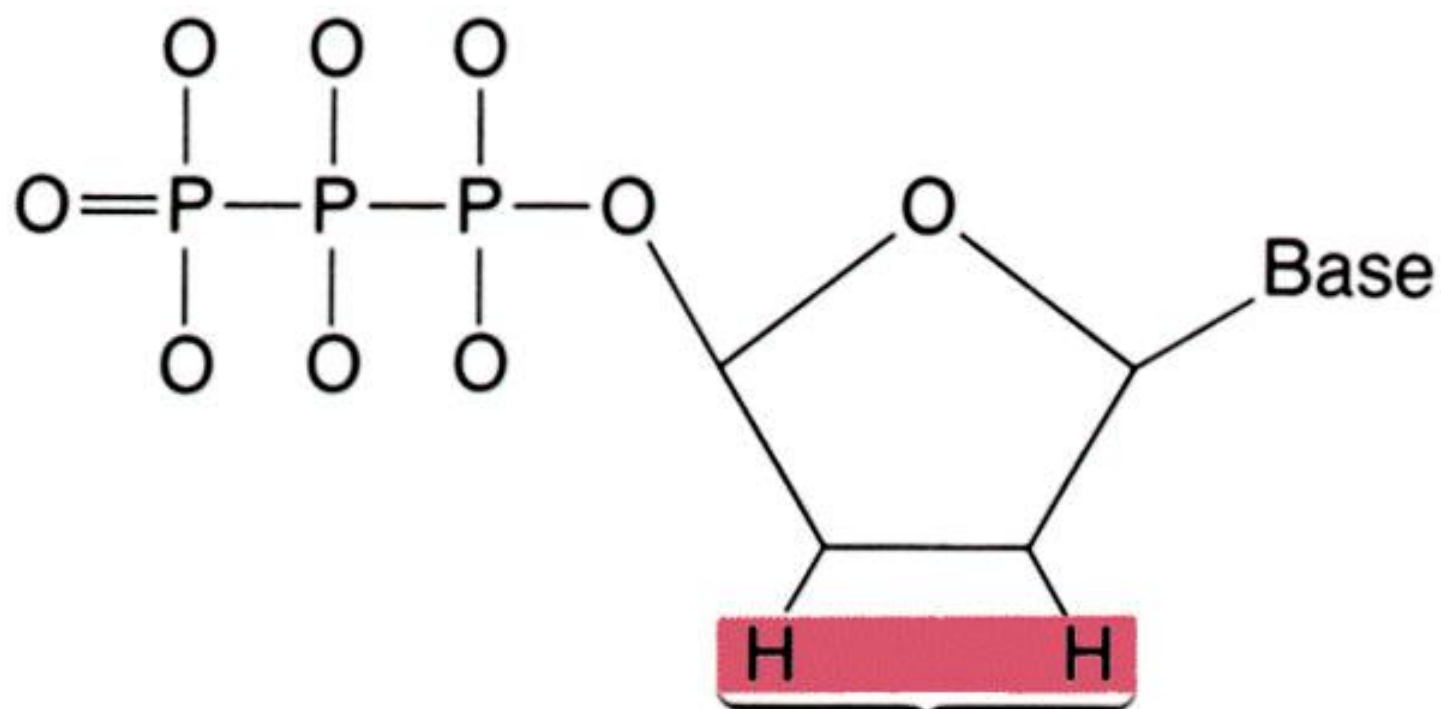
- **Dia 19/09**
- **História da Genética Molecular, Propriedades dos ácidos nucléicos. (T)**
- **Molecular structure of nucleic acids. Nature, 171: 737-738 (1953).**
- **Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, 171: 964-967 (1953)**
- **Succeeding in science: rules of thumb. Science, (1993).**
- **Bactérias em Biologia Molecular (T)**
- **Exercícios I (para ser discutido em 26/09)**

Dia 26/09

- **Avaliação de leitura dos seminários do dia 26/09**
- **Organização e funcionalidade do genoma (T)**
- **Seminário 1: Riboswitches and Translation Control.** Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a032797
- **Apoio Sem 1: Small-Molecule-Binding Riboswitches.** Microbiol Spectrum 6(4):RWR-0025-2018. doi:10.1128/microbiolspec.RWR-0025-2018.
- **Seminário 2: What Are 3' UTRs Doing?** Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a034728
- **Exercício II (para ser discutido em 03/10)**

Pyrimidine nucleotides





Cannot form a
phosphodiester bond
with next incoming dNTP