



Introdução à Biologia Molecular

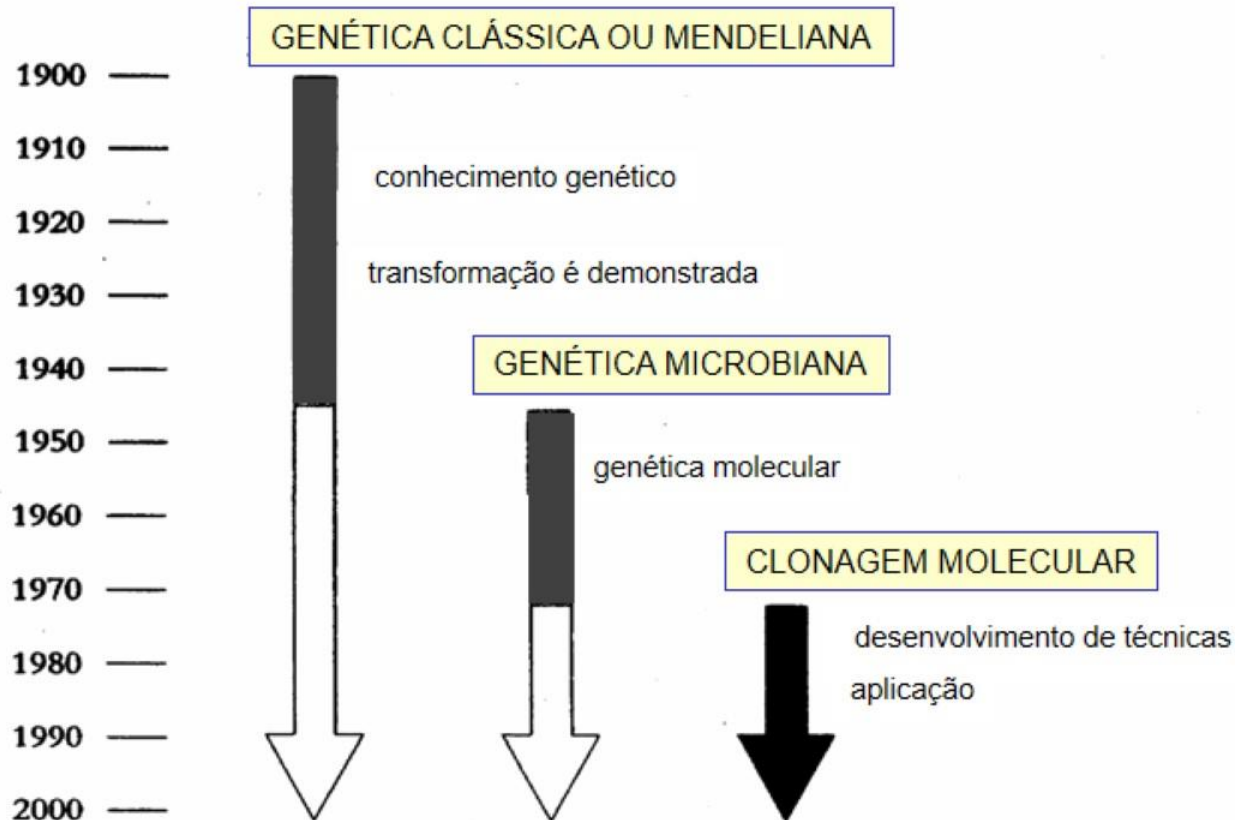
Métodos diagnóstico de agentes infecciosos





Métodos de Biologia Molecular

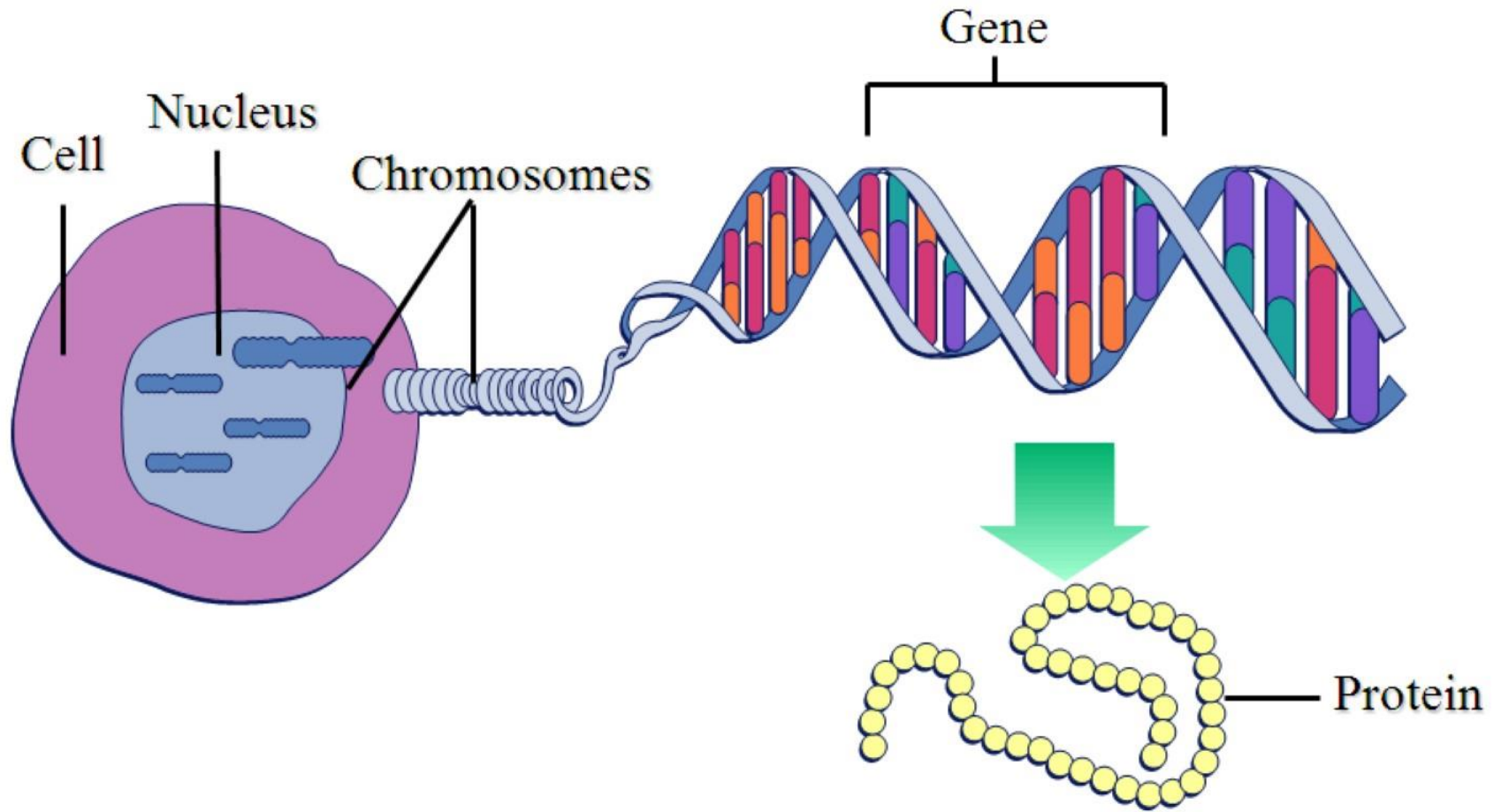
Desenvolvimento do conhecimento Gênico

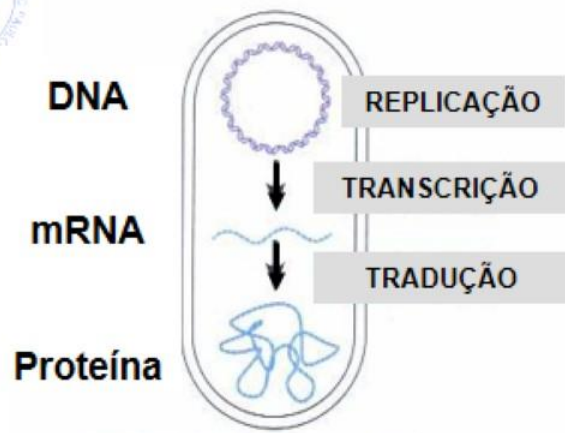


As áreas escuras representam o período de maior desenvolvimento dos respectivos temas

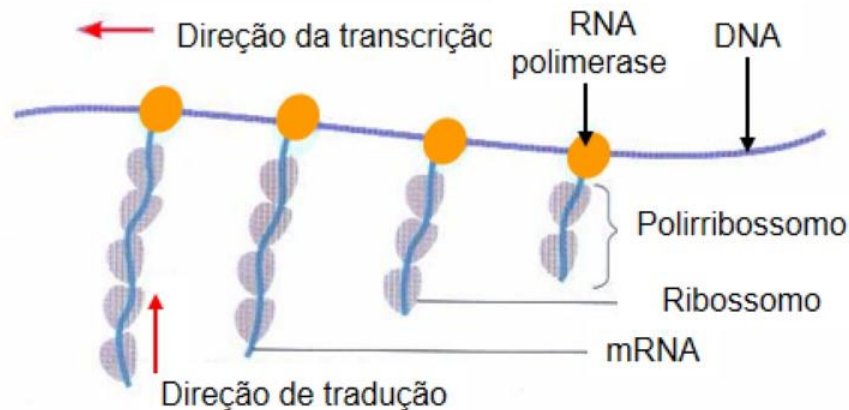
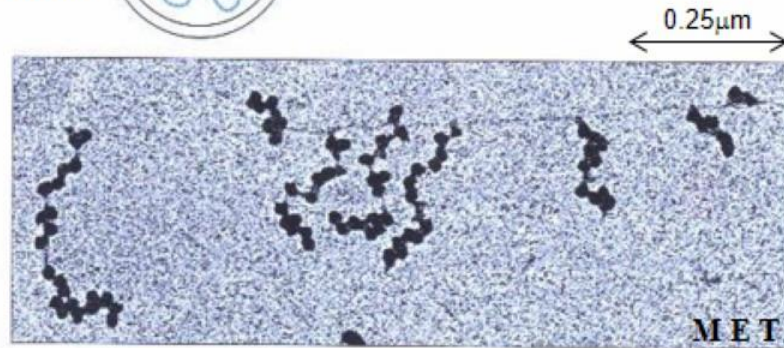


Cromossomo - gene - DNA





Conceitos básicos de genética clássica

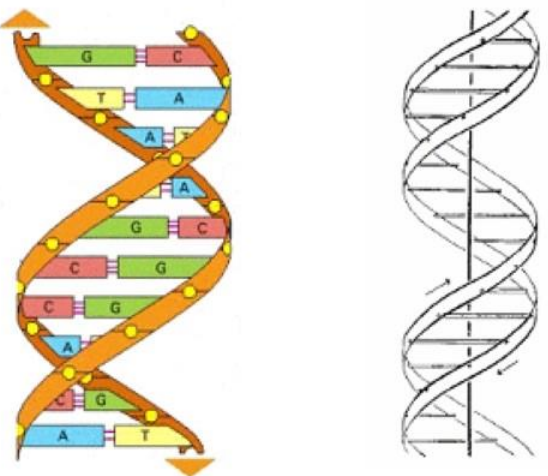


O Dogma Central da Biologia Molecular

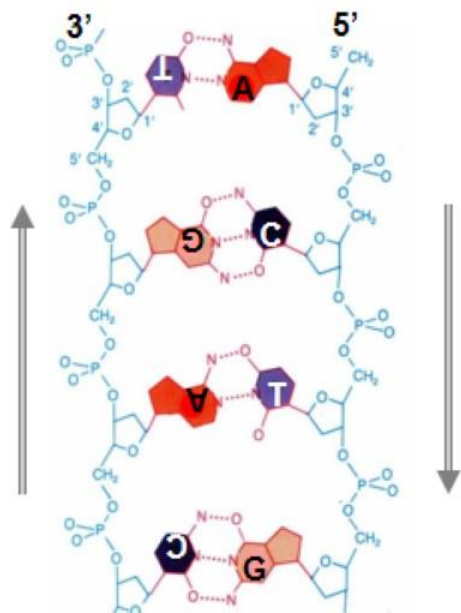
Proposto por sir Francis Crick em 1958 na tentativa de relacionar o DNA, o RNA e proteínas.

O DNA pode se replicar e dar origem a novas moléculas de DNA, pode ainda ser transcrito em RNA, e este por sua vez traduz o código genético em proteínas

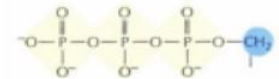
Replicação do DNA



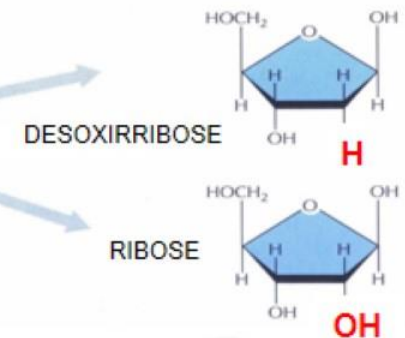
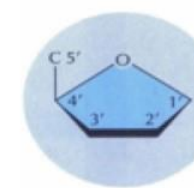
Desenho do trabalho de Watson e Crick representando a estrutura do DNA



1 FOSFATOS



2 AÇÚCARES (pentose)

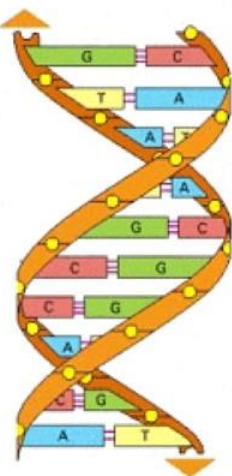


3 BASES NITROGENADAS

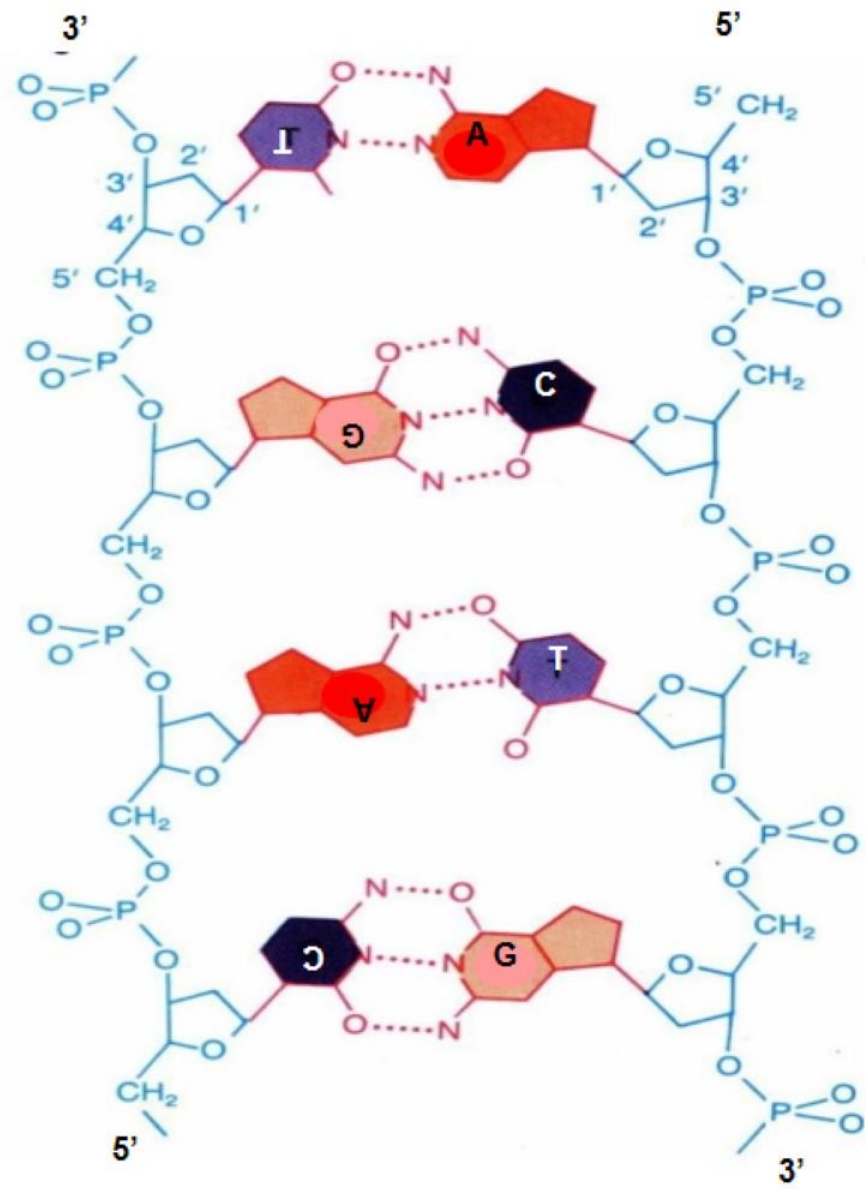




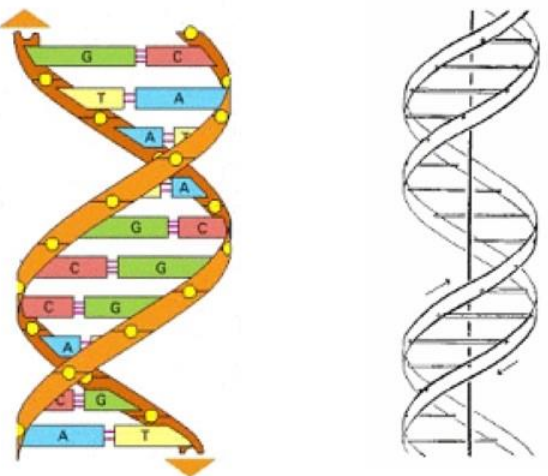
Replicação do DNA



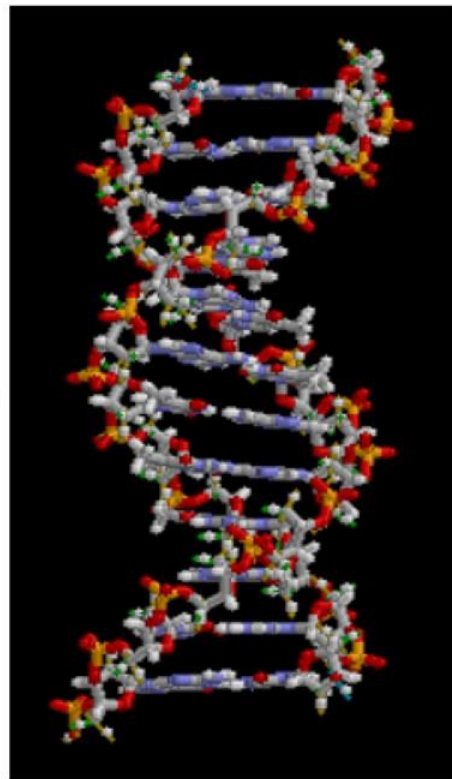
Desenho do trabalho de Watson e Crick representando a estrutura do DNA



Replicação do DNA



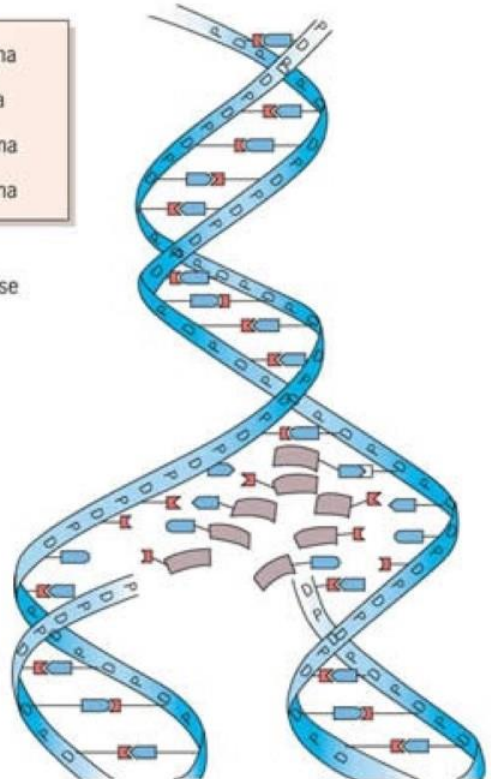
Desenho do trabalho de Watson e Crick representando a estrutura do DNA



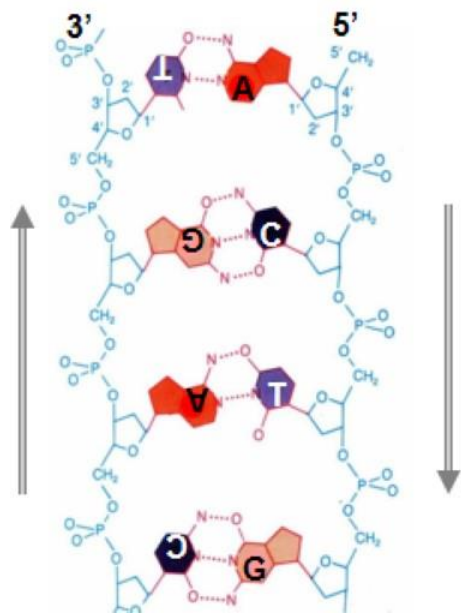
Esquema de duplicação de DNA

- Adenina
- Timina
- Citosina
- Guanina

P = Fosfato
D = Desoxirribose



Hipótese proposta por W & C
Replicação é **Semi-conservativa**



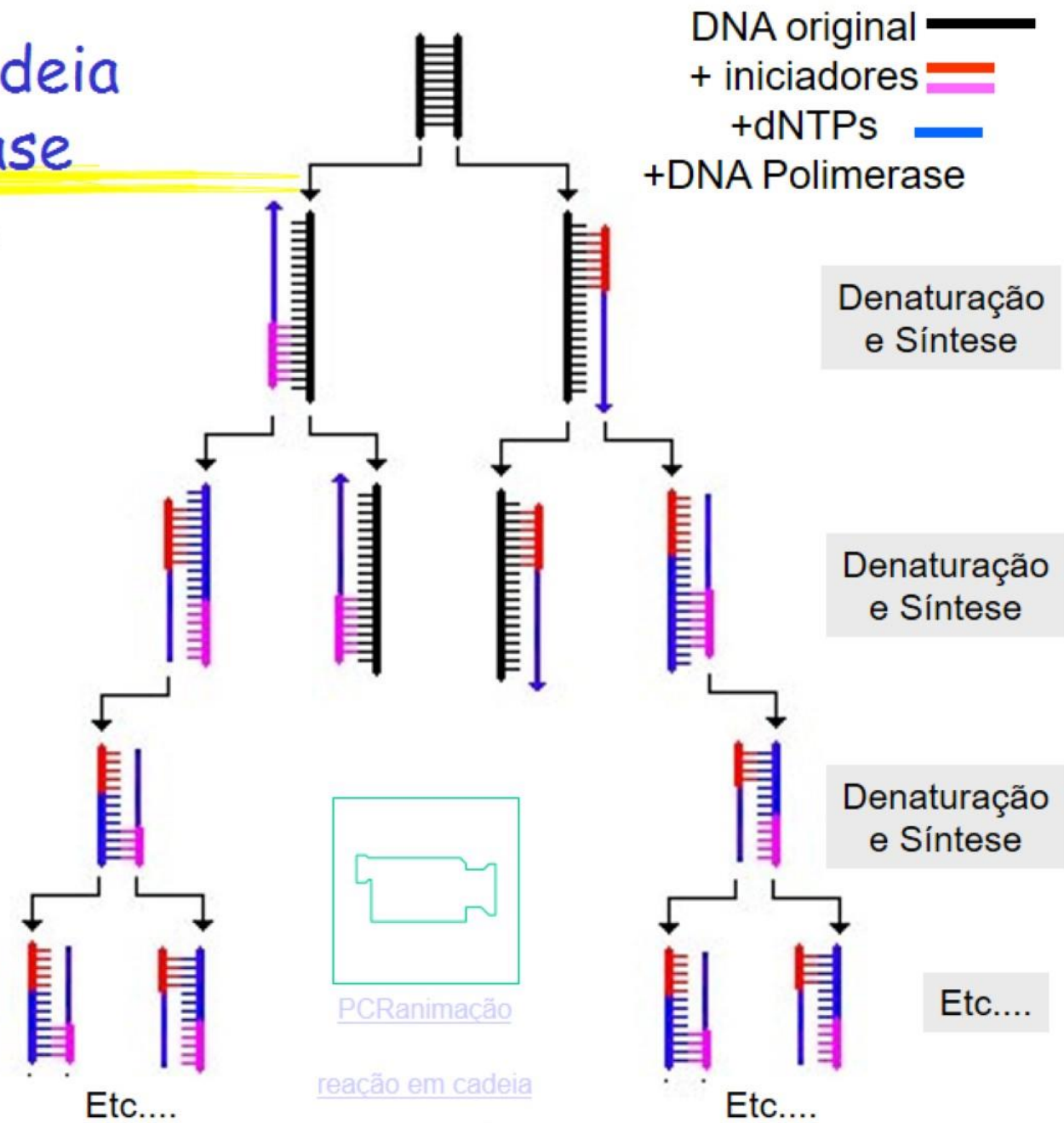


Reação em cadeia da Polimerase

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



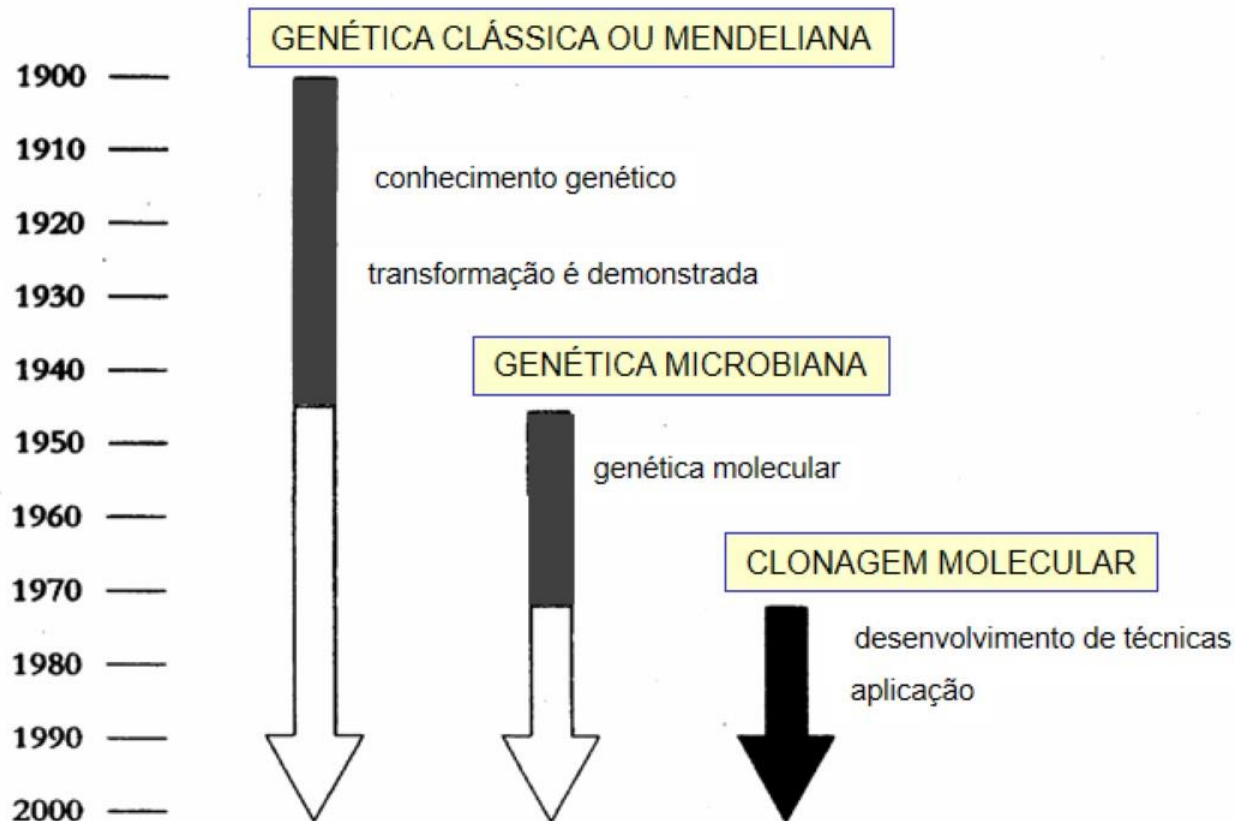
Kary B. Mullis PNQ 93





Métodos de Biologia Molecular

Desenvolvimento do conhecimento Gênico



As áreas escuras representam o período de maior desenvolvimento dos respectivos temas

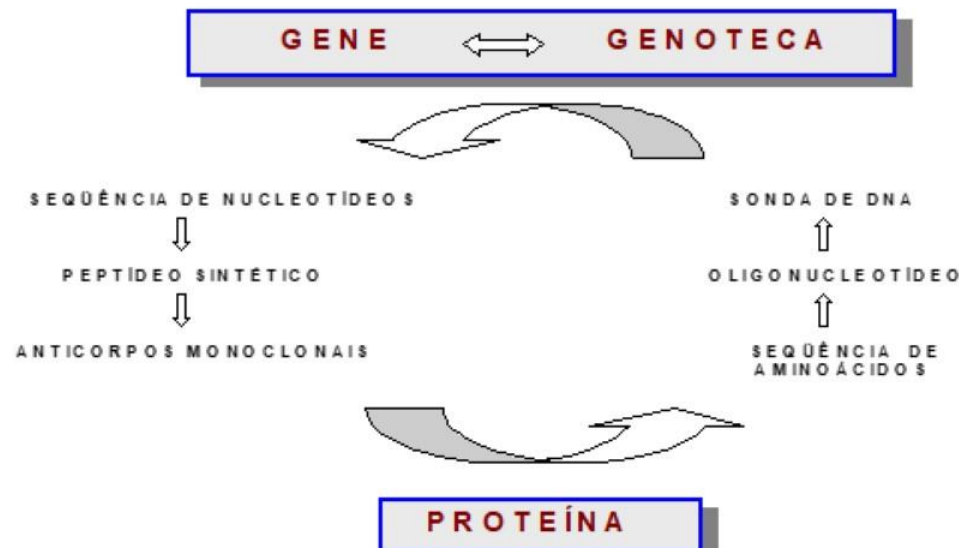


Métodos de Biologia Molecular

Como já foi bastante comentado, os métodos de biologia molecular dependem do (e foram desenvolvidos com base no) entendimento das propriedades das moléculas biológicas

Cap 20 - Molecular Biology of the Gene, James Watson e cols (5ª Ed., 2004) - pg 647

- técnicas de manipulação de ac. nucléicos (do isolamento, às comparações genômicas)
- técnicas de isolamento e análises de proteínas (da purificação aos métodos de análise proteômicas)





Aplicação prática e definição de alguns conceitos

GENE



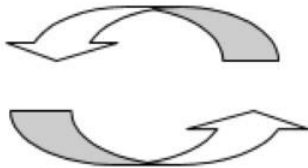
técnicas:

Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot



PROTEÍNA



Síntese de Peptídeos

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :

conceitos – definições :

Tecnologia do DNA Recombinante - CLONAGEM

Ferramentas Biotecnológicas - *enzimas; vetores,*

Análise de um DNA - *genotecas; DNA sintético, Gel*

Seleção de um clone - *varredura (screening), Hibridização ou Hibrição*

Expressão de um gene

Aplicações da Biologia Molecular - *em terapia e diagnóstico médico*

Questões de Segurança e Ética



Clonagem molecular: DEFINIÇÃO

Definição de clonagem molecular: A clonagem molecular é o processo de construção de moléculas de DNA recombinante e da sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitam a seleção do DNA recombinante.

Esta tecnologia permite estudar os genes e os seus produtos, obter organismos transgênicos e realizar terapia gênica.

Expressões utilizadas com o mesmo significado:

- clonagem molecular
- engenharia genética
- manipulação gênica
- clonagem gênica
- tecnologia do DNA recombinante
- modificação genética



Clonagem molecular: APLICAÇÕES

1- Ferramentas para Pesquisa Básica:

2- Diagnóstico: agentes de doenças infecto-parasitárias

- Produção em larga escala de **proteínas recombinantes** para kits de ELISA, etc.
- **Sondas de DNA** (hibridização e/ou PCR): diagnóstico de paternidade, aplicações forenses, doenças genéticas, estudos antropológicos, arqueológicos e filogenéticos.

3- Produção de Substâncias Biologicamente Ativas: uso terapêutico, como :insulina, δ -interferon, fator VIII de coagulação, hormônio de crescimento; VANTAGENS → pureza do fármaco, idêntico ao natural, custo de produção e reprodutibilidade.

4- Produção de Vacinas: definição e pureza do antígeno, reprodutibilidade e custo de produção

5- Alteração das características animais e vegetais:

- Produção de organismos **transgênicos**. a) melhores índices de produtividade (prod. comercial), b) imunidade a doenças e pragas, c) melhor valor biológico (proteína ricas em AA essenciais em vegetais), d) modelos de estudo em pesquisa.
- Terapia gênica.



Clonagem molecular: VIABILIZAÇÃO

descobertas e desenvolvimentos importantes para viabilizar o processo de clonagem molecular

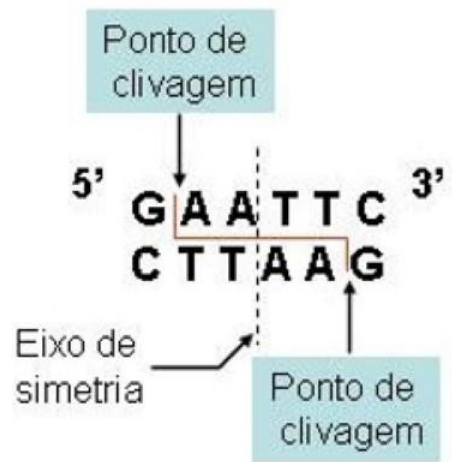
- 1- Sistemas de Restrição e de Modificação (Enzimas de Restrição, Ligase, Polimerases, etc)
- 2- Vetores de Clonagem
- 3- Métodos de transformação de células eucarióticas e procarióticas



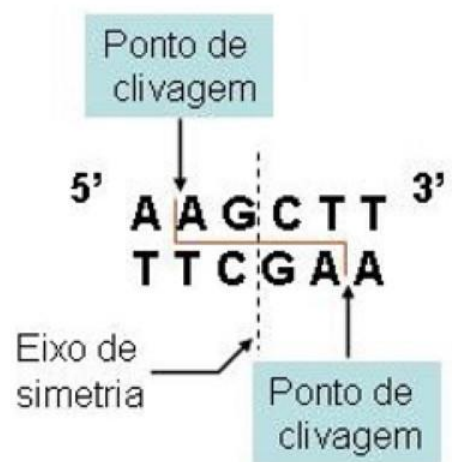
1 - Genoteca: **genômica** - Enz. restrição

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

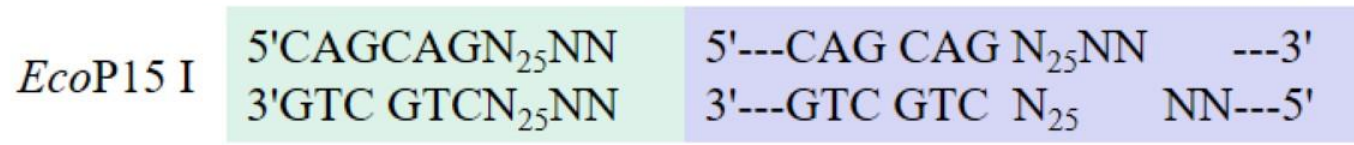
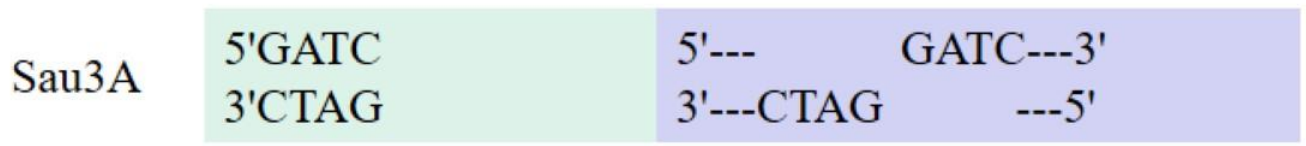
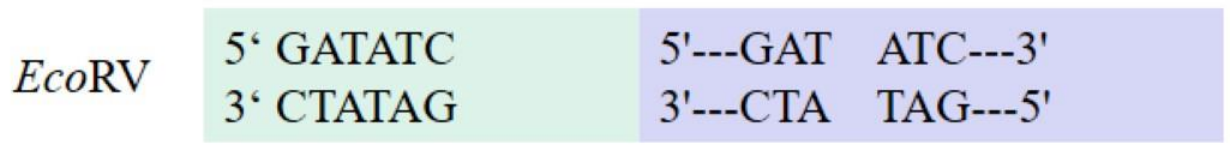
Eco RI



Hind III



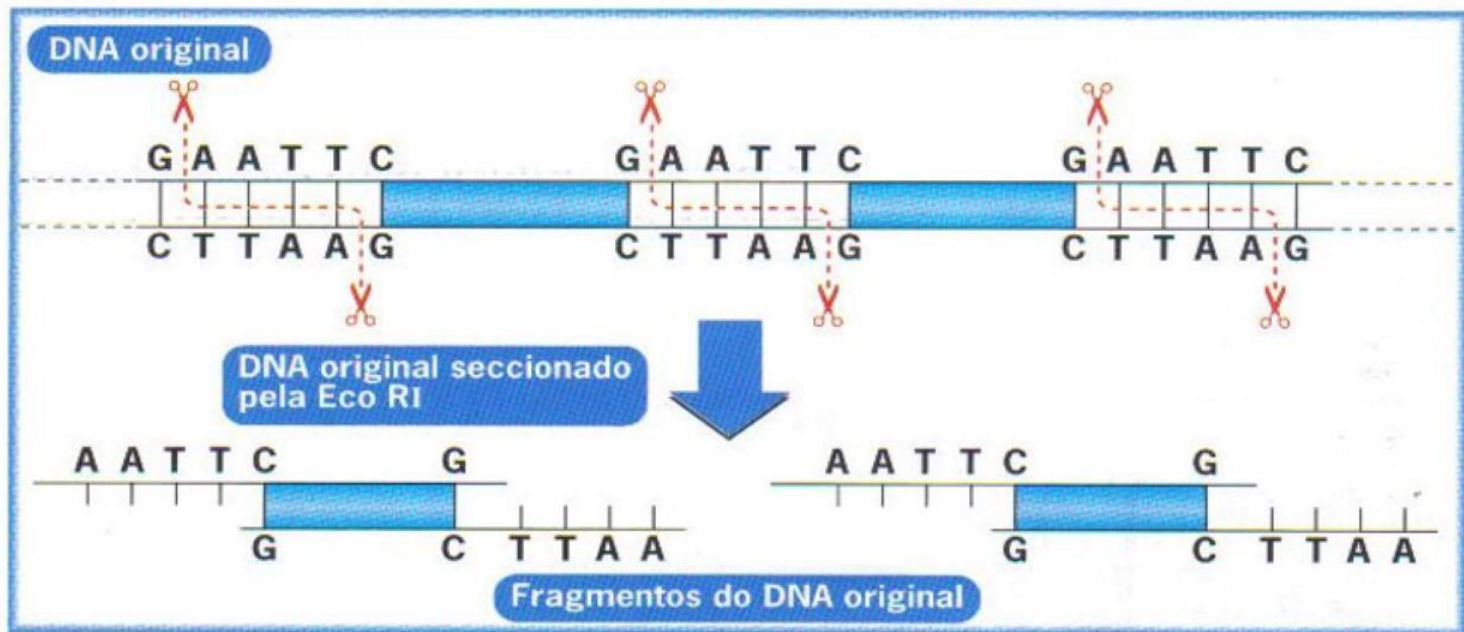
EcoRI	Significado	Descrição
E	<i>Escherichia</i>	Gênero
co	<i>coli</i>	Espécie
R	RY13	Cepa
I	1ª identificada	Ordem de identificação



Exp. de
utilização



1 - Genoteca: genômica - Enz. restrição





Métodos de clonagem molecular

- 1 Genoteca: **genômica** - Enz. restrição, seringa, DNase
c-DNA - genes de uma fase evolutiva específica
- 2 Vetores: bacteriófagos, plasmídios, cosmídios, leveduras, etc
- 3 Construção Genoteca - vetores de substituição,
inserção,
expressão.
- 4 Seleção dos Clones : XGal + IPTG (**químico**),
P³² (**radioativo**),
AC (**imunológico**)



Etapas na construção de uma Genoteca

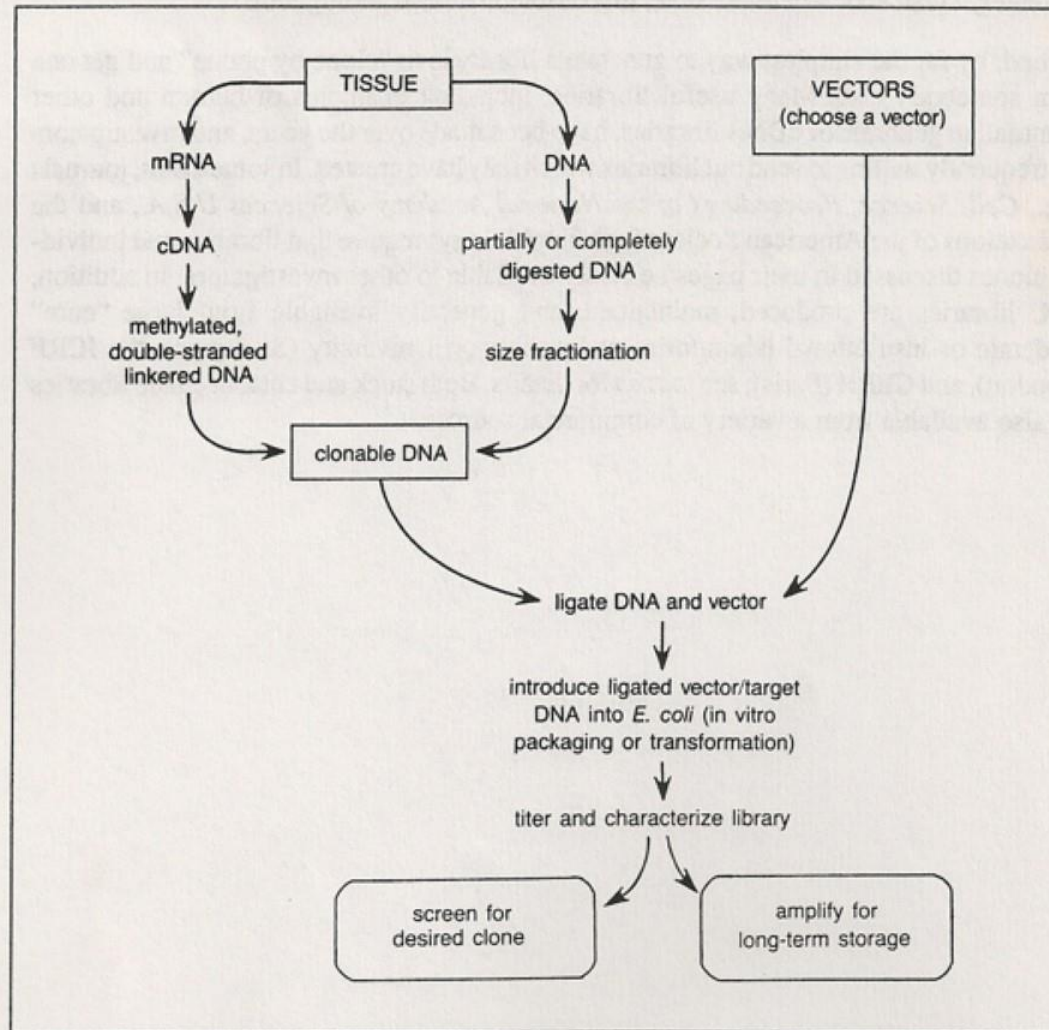


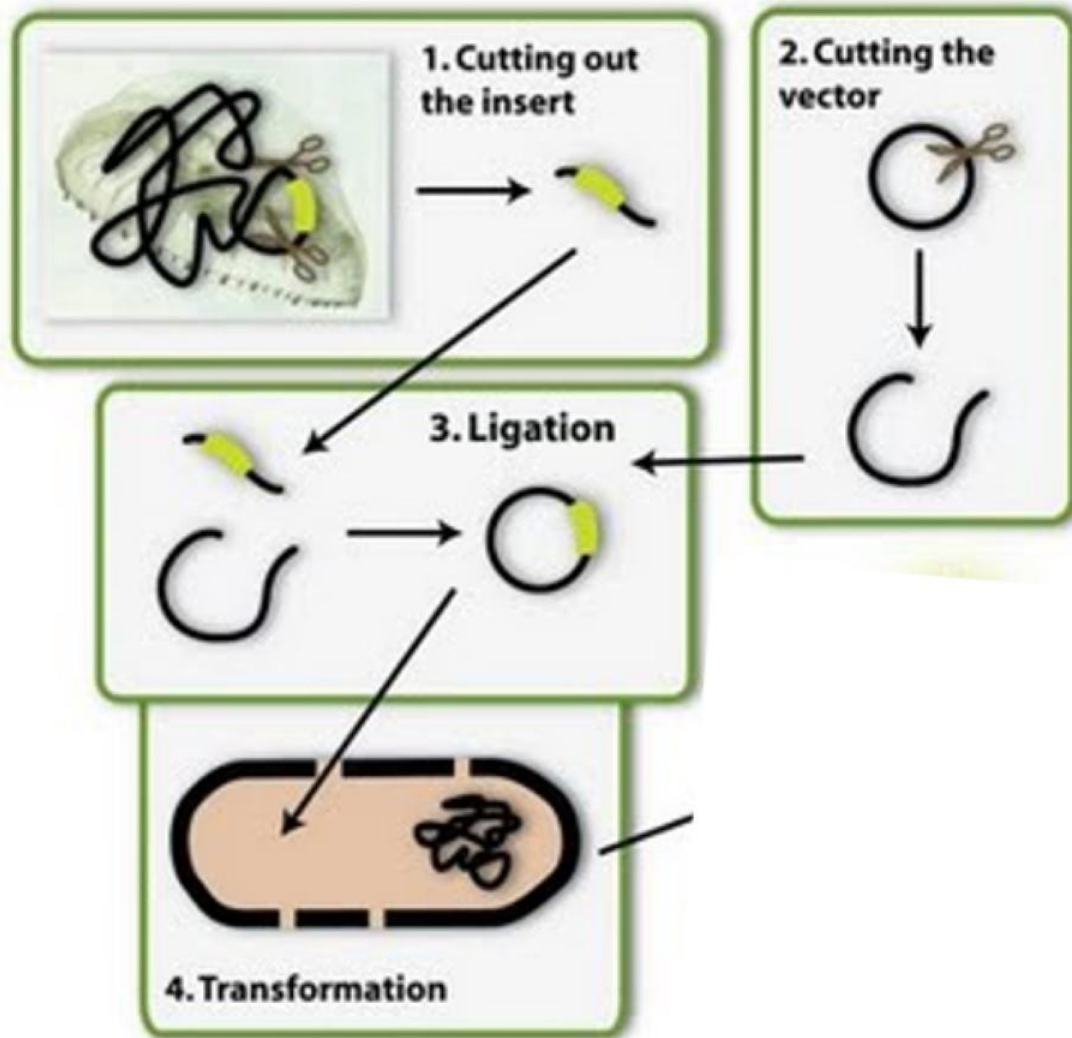
Figure 5.01 Steps involved in the construction of cDNA or genomic DNA libraries.

Construction of
Recombinant
DNA Libraries

5.03

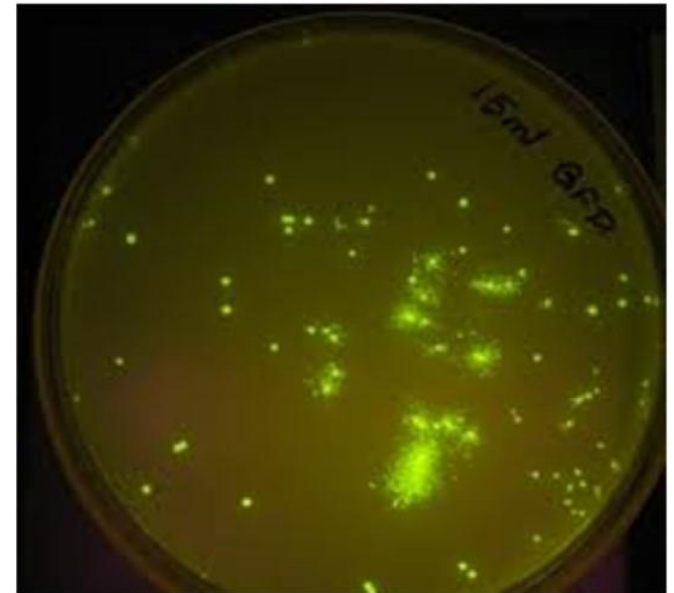
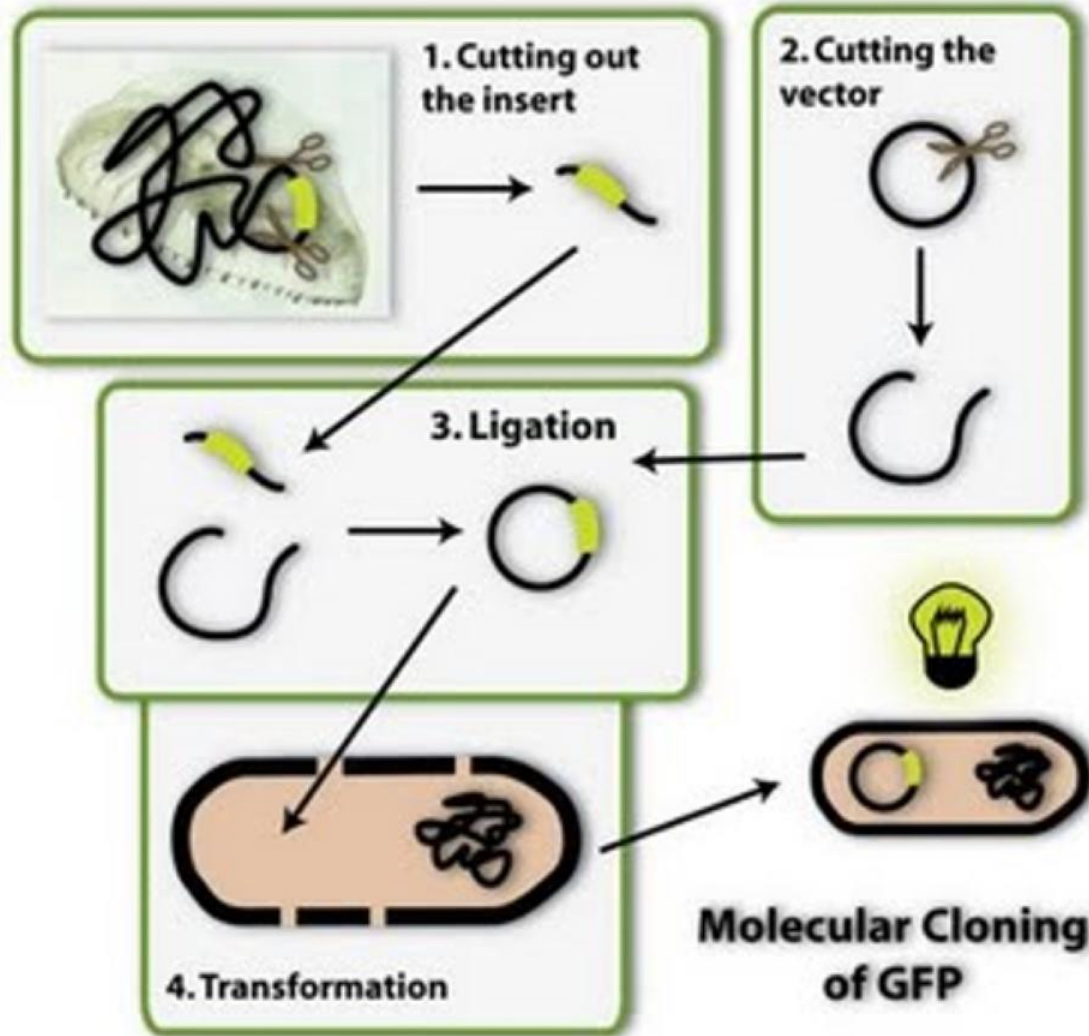


Etapas na construção de uma Genoteca de expressão





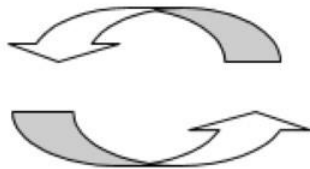
Etapas na construção de uma Genoteca de expressão





Aplicação prática e definição de conceitos (2)

GENE



PROTEÍNA



técnicas:

Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

Síntese de Peptídeos

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :

conceitos – definições :

Tecnologia do DNA Recombinante - CLONAGEM

Ferramentas Biotecnológicas - *enzimas; vetores,*

Análise de um DNA – *genotecas;*

Seleção de um clone - *varredura (screening), Hibridização ou Hibridação*

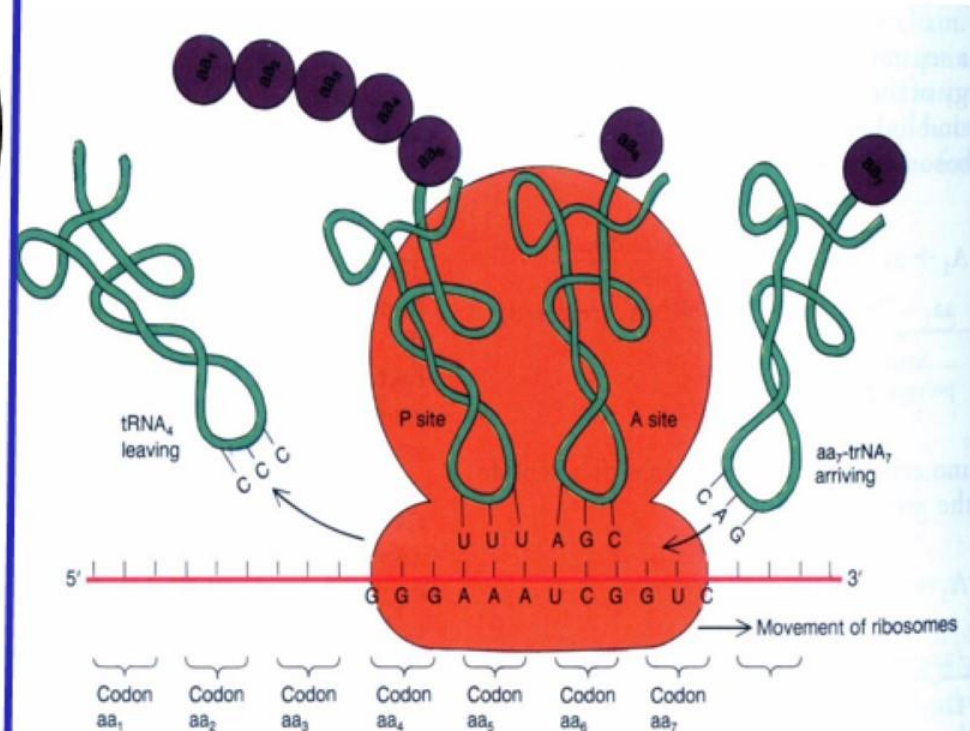
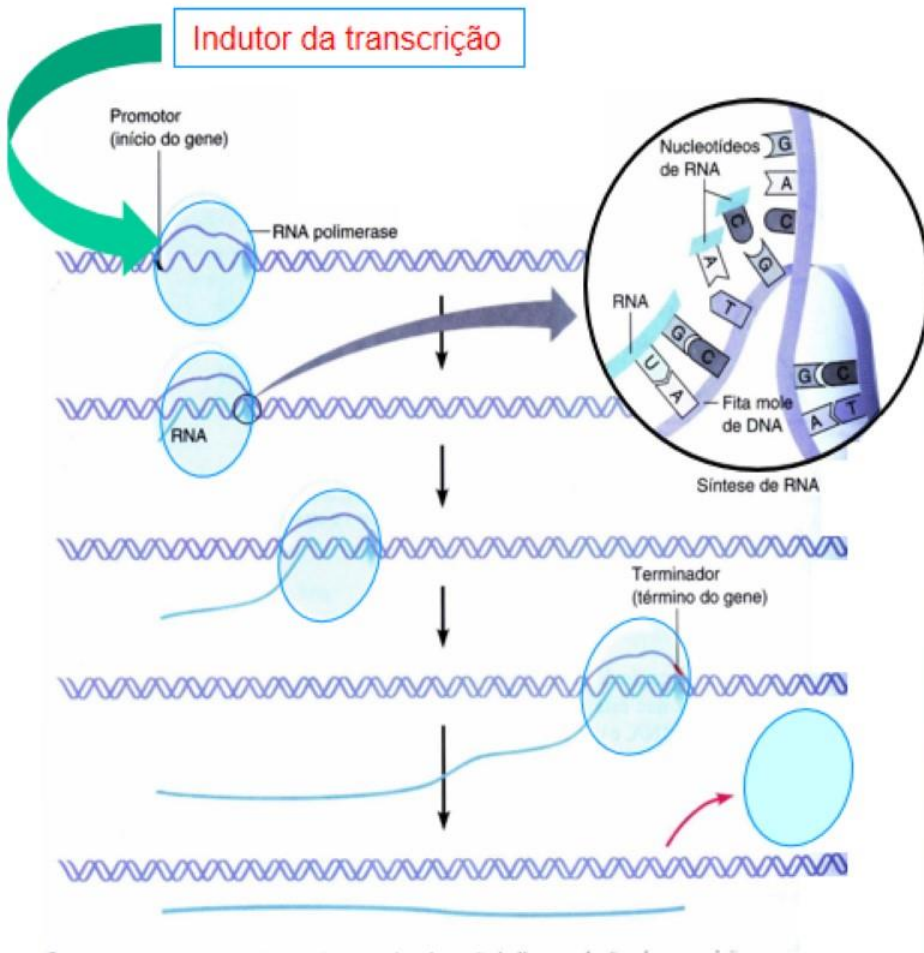
Expressão de um gene

Aplicações da Engenharia Genética - *em terapia e diagnóstico médico*

Questões de Segurança e Ética



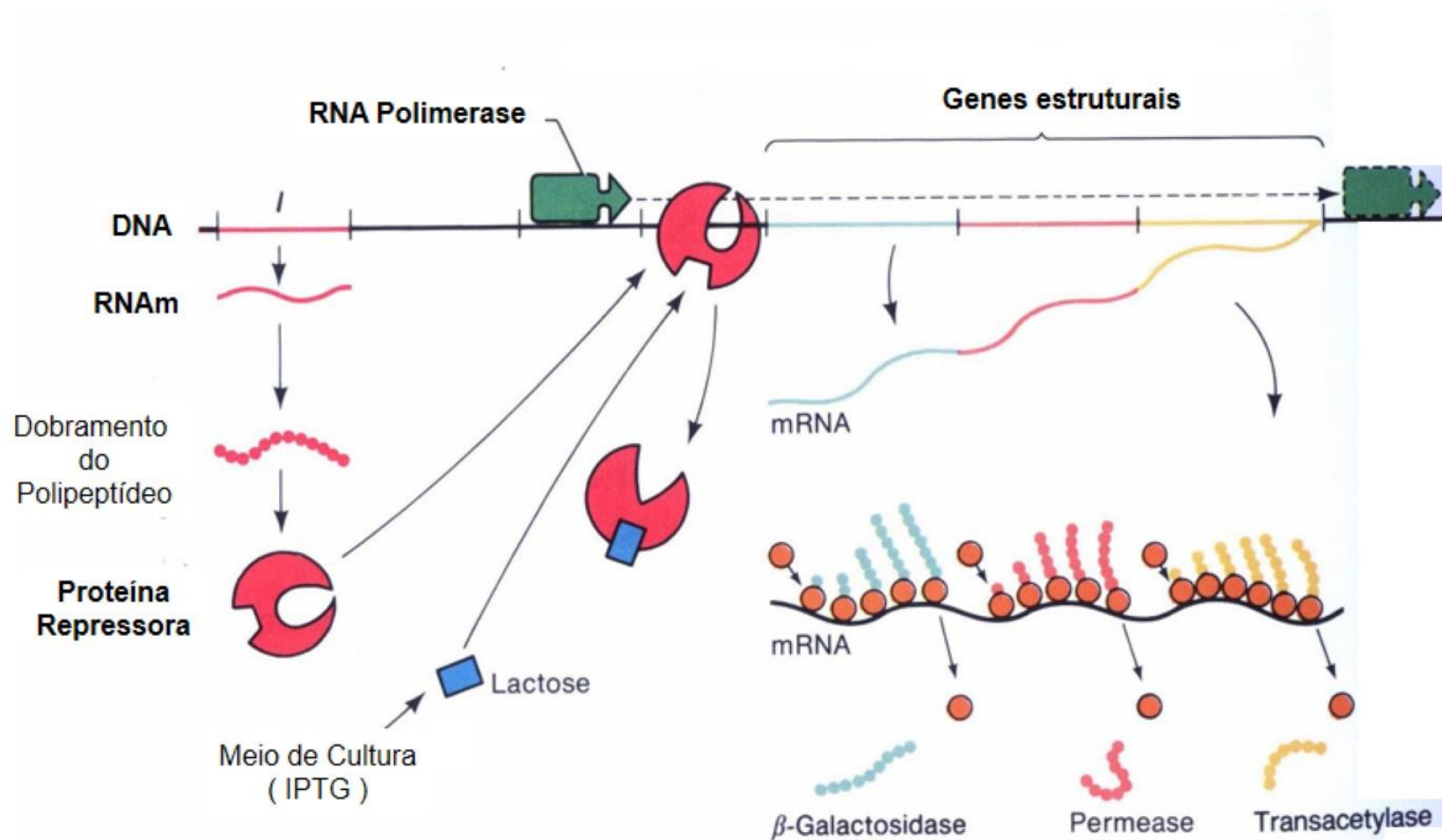
Transcrição do DNA para o RNA + Tradução do RNA





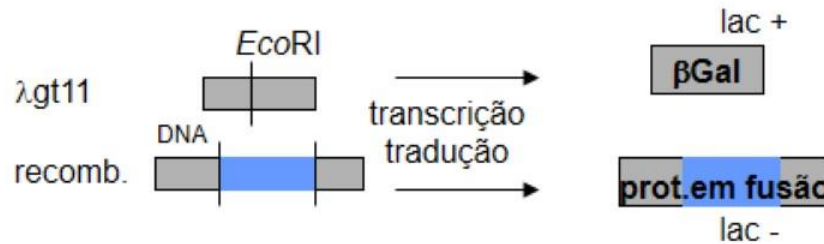
Regulação da Expressão Gênica

Regulação do operon da lactose (operon *lac*)



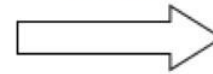


Seleção Química de clones recombinantes

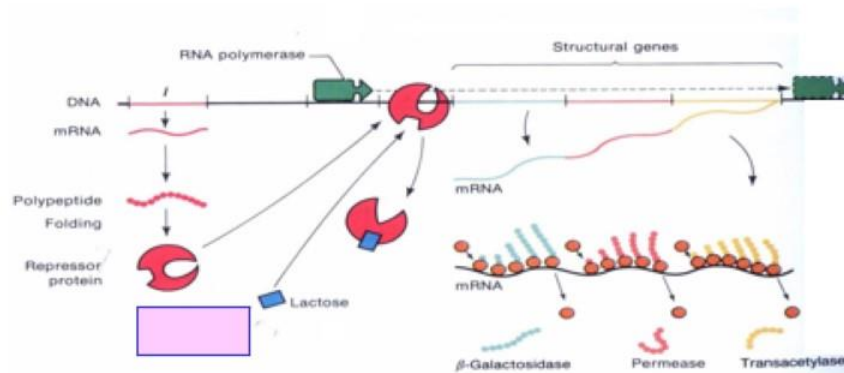


ATIVIDADE ENZIMÁTICA

X-Gal



SEM ATIVIDADE ENZIMÁTICA



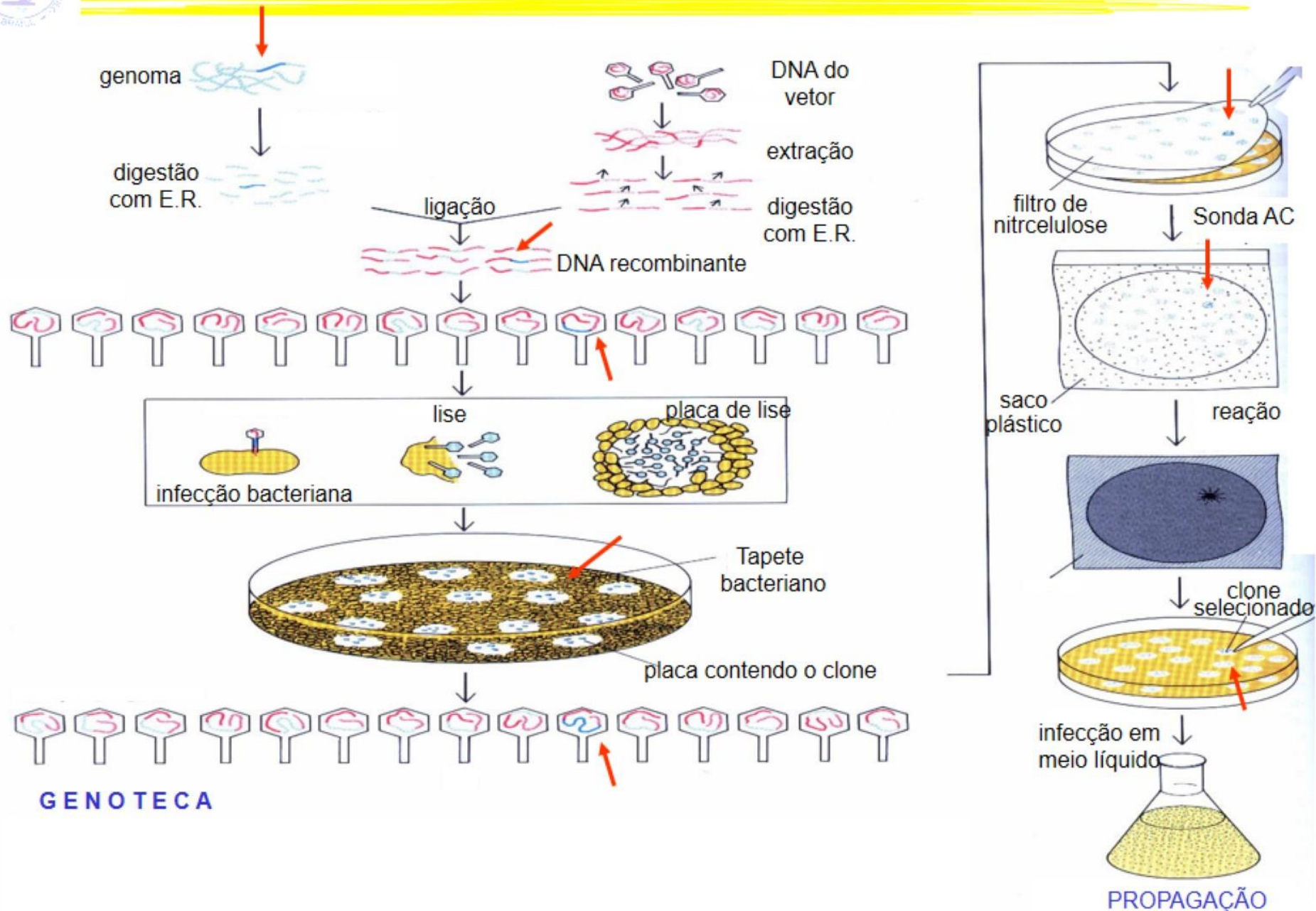
IPTG + X-Gal

Produto azul





Seleção de clones expressores



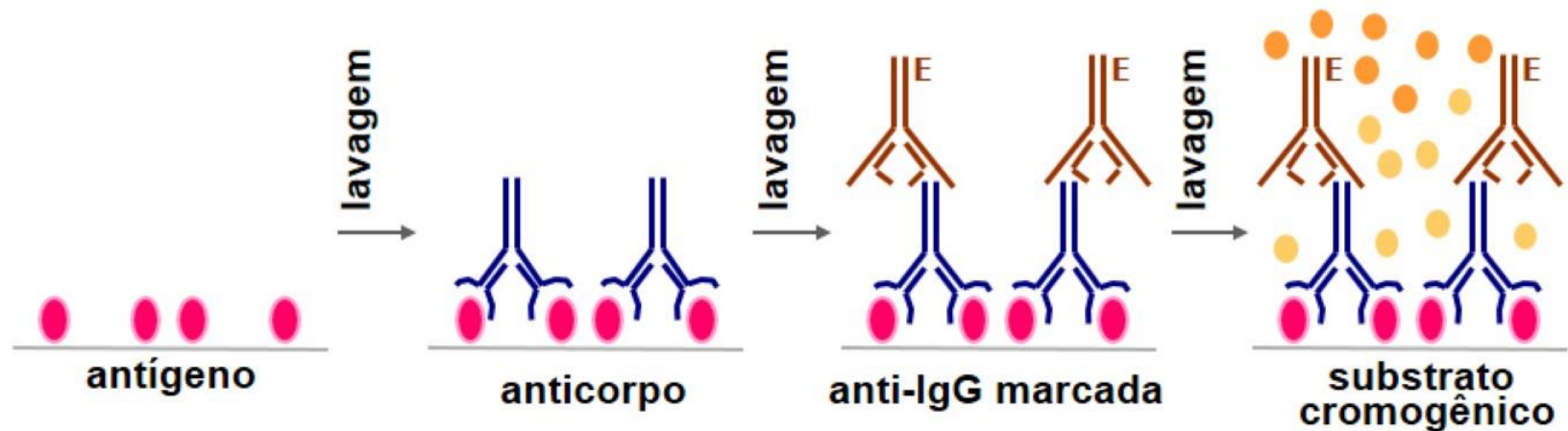


Imunoseleção de clones expressores

Reação Primária -- ligação dos grupos reativos da molécula antigênica com um dos dois sítios de combinação da molécula de anticorpo.

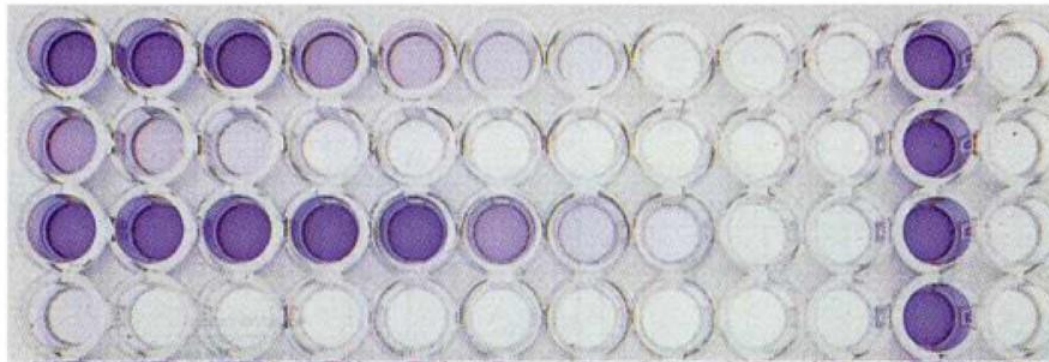
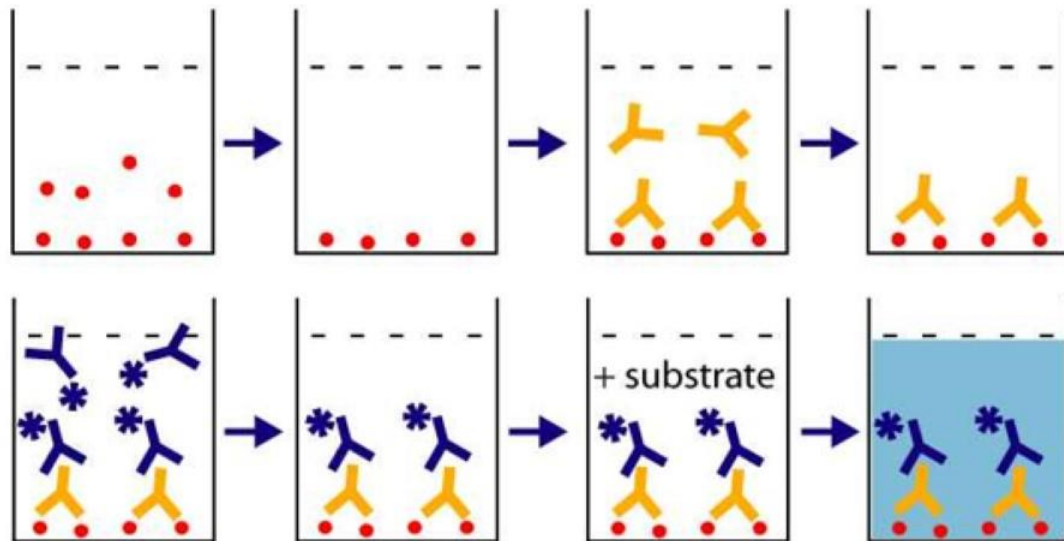
Reação Secundária -- visualização direta ou com auxílio de lupas da precipitação ou da aglutinação.

Reação Terciária -- expressão biológica da interação Ag-AC.





E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)



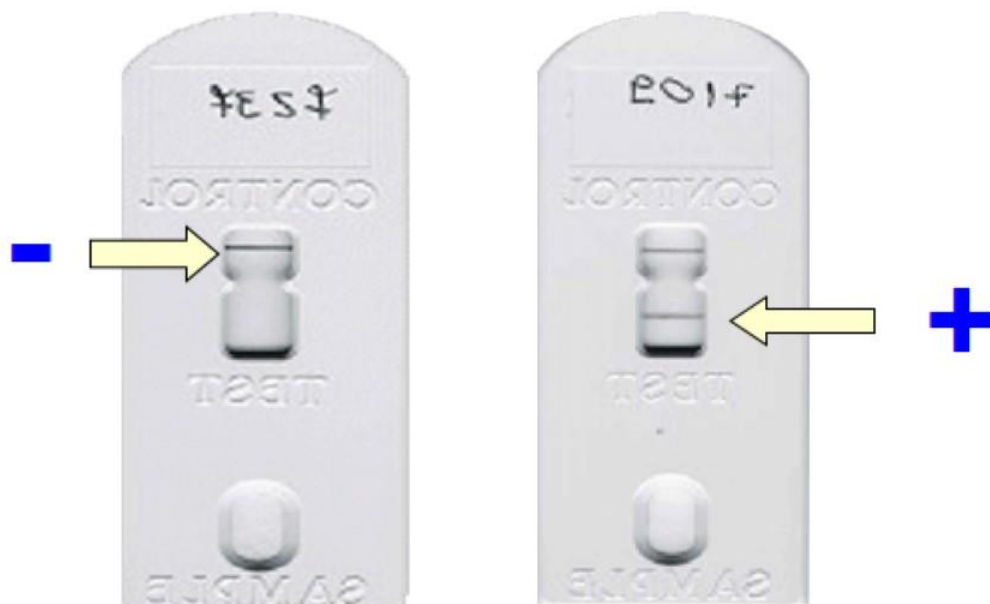


Kit para Diagnóstico da Doença de Chagas Stat-Pak



Diag.Microbiol.Inf.Dis. 2003; 46:265-

271



Teste Imunocromatográfico

Chembio Diagnostic Systems

CHAGAS STAT-PAK

A rapid immunochromatographic assay for the detection of antibodies to Chagas in serum or plasma

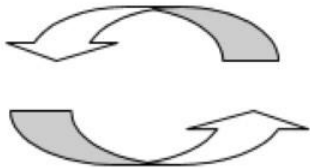
Lot and Expiration Date Printed on Pouches
For In Vitro Diagnostic Use Store at Room Temp
See Insert For Directions For Use
Chembio Diagnostics, Medford, New York 11763

LOT: CH010997
EXP: 31 DEC 98
For Export Only



Aplicação prática e definição de conceitos (3)

GENE



PROTEÍNA



técnicas:

Padrão de Digestão : RFLP

Seq. de Nucleotídeos : Genotipagem

PCR

Hibridização : Southern, Northern, Dot-Blot

Síntese de Peptídeos

Expressão Gênica : Análise funcional

Proteoma :

conceitos – definições :

Tecnologia do DNA Recombinante - CLONAGEM

Ferramentas Biotecnológicas - *enzimas; vetores,*

Análise de um DNA - *genotecas; DNA sintético, Gel*

Seleção de um clone - *varredura (screening), Hibridização ou Hibridação*

Expressão de um gene

Aplicações da Engenharia Genética - *em terapia e diagnóstico médico*

Questões de Segurança e Ética



Identificação de uma molécula específica de DNA

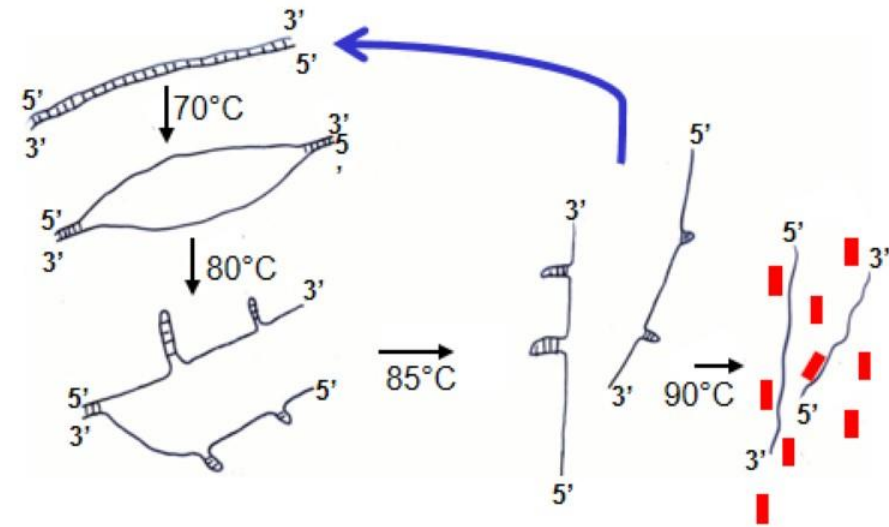
Propriedade físicas e químicas do DNA:

- Viscosidade

Sedimentação em Gradiente de CsCl (+ CG, + denso)

- Denaturação: Química - $\text{pH} < 4$ ou > 11 (NaOH)

Física - T_m (proporcional ao CG)



Capacidade do DNA denaturado de reanelar



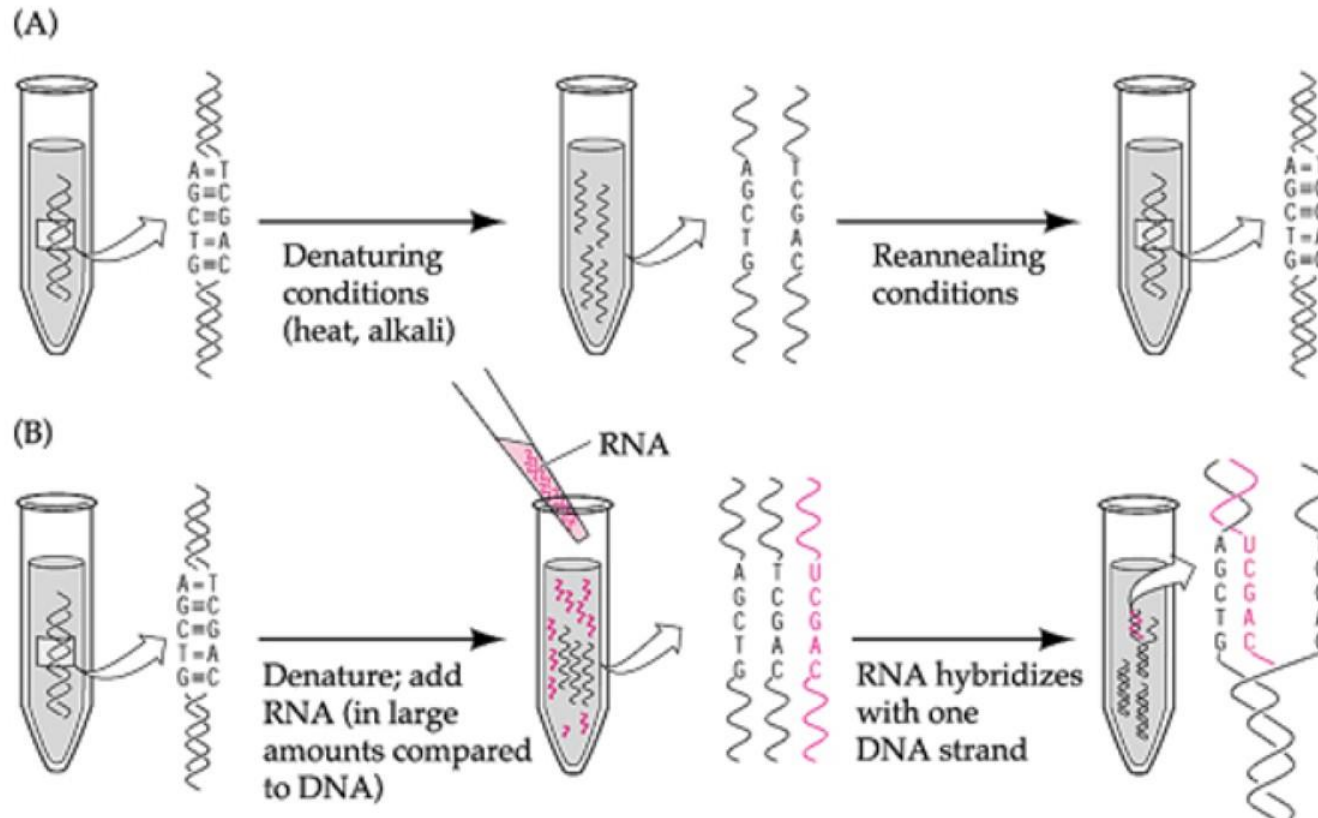
Formação de moléculas híbridas quando DNAs homólogo e denaturados de duas fontes diferentes são colocados sob condições de temperatura e força iônica apropriadas

H
I
B
R
I
D
I
Z
A
Ç
Ã
O



Hibridização identificando uma molécula específica de DNA

Hibridização é o processo de pareamento entre dois polinucleotídeos simples fita e complementares



SONDA

1. ser capaz de se ligar a uma molécula com seq. complementar

- frag/o. purificado
- sintético

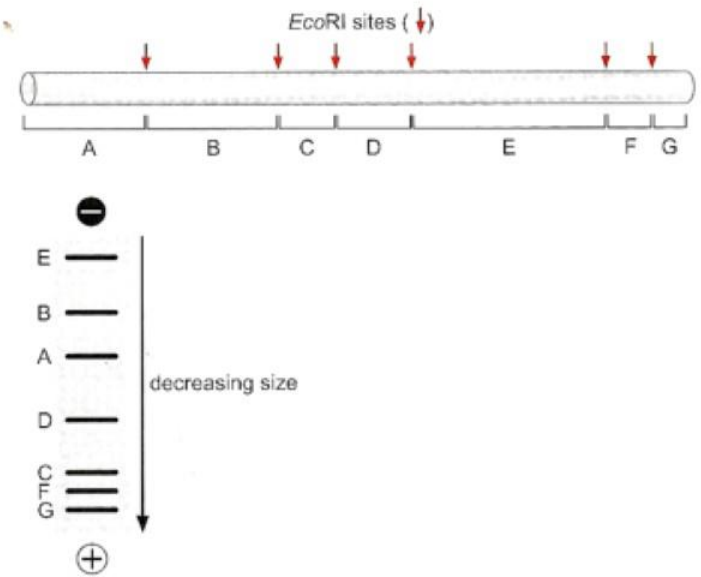
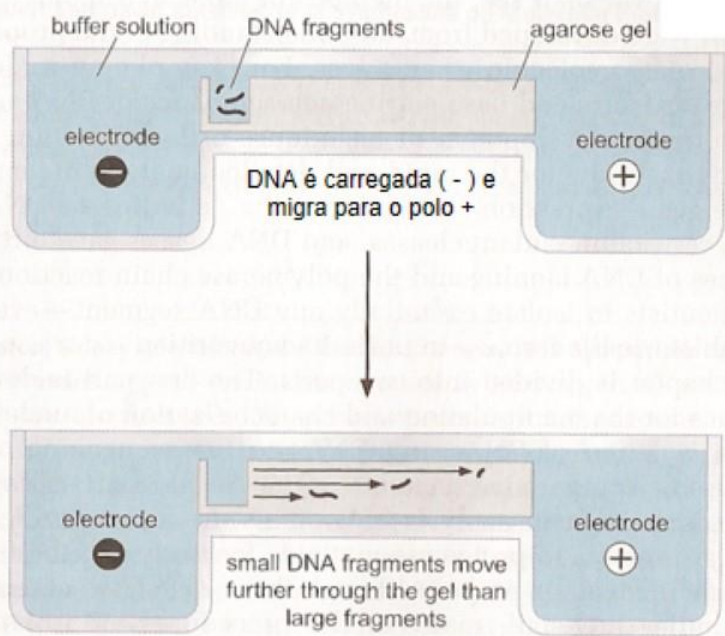
2. estar marcada

- p^{32}
- Fluorescência



Separação de moléculas de DNA e RNA por tamanho

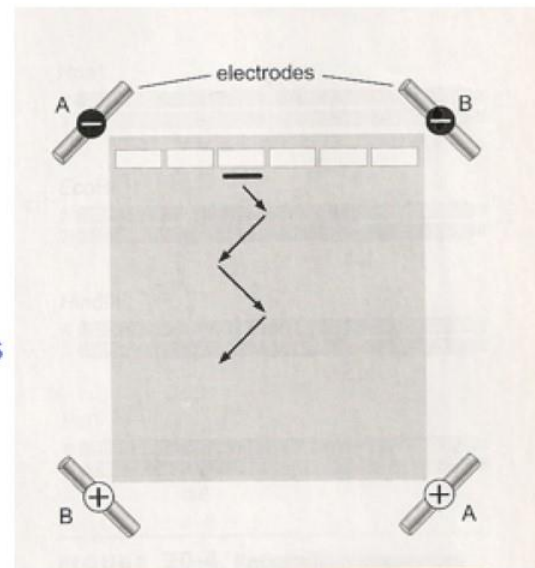
Qdo submetidas a um campo elétrico em material poroso



AGAROSE

POLIACRILAMIDA → > poder de resolução

PULSED – FIELD agarose Gel (CHEF) → Moléculas Longas
Clamped Homogeneous Electrical Field



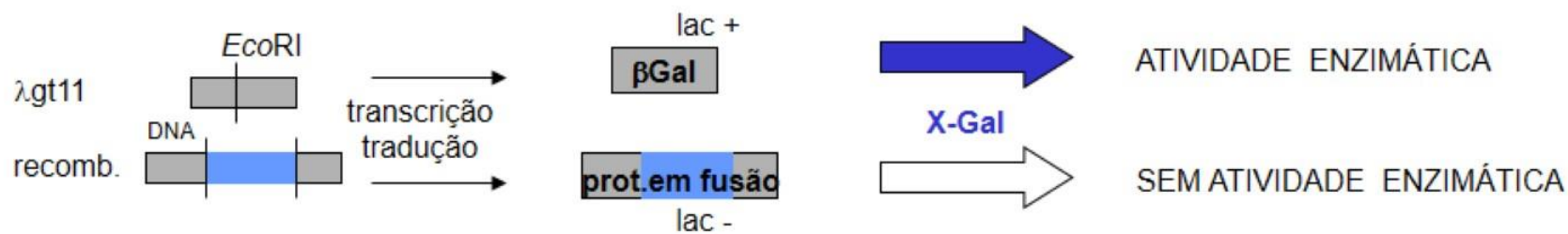


Métodos de Biologia Molecular

Acho q já está bom... Boa tarde!!



Clones recombinantes expressores



IPTG + **X-Gal**



Produto azul



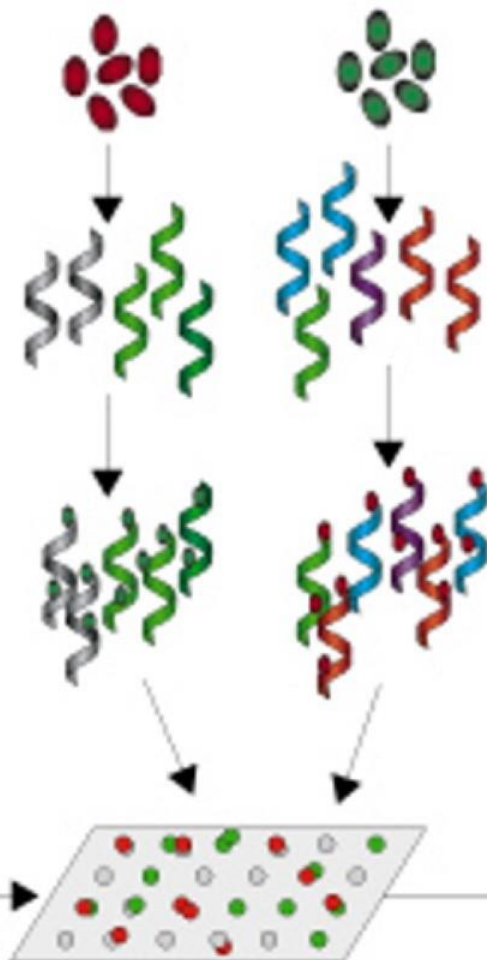


Hibridização em Mycroarrays

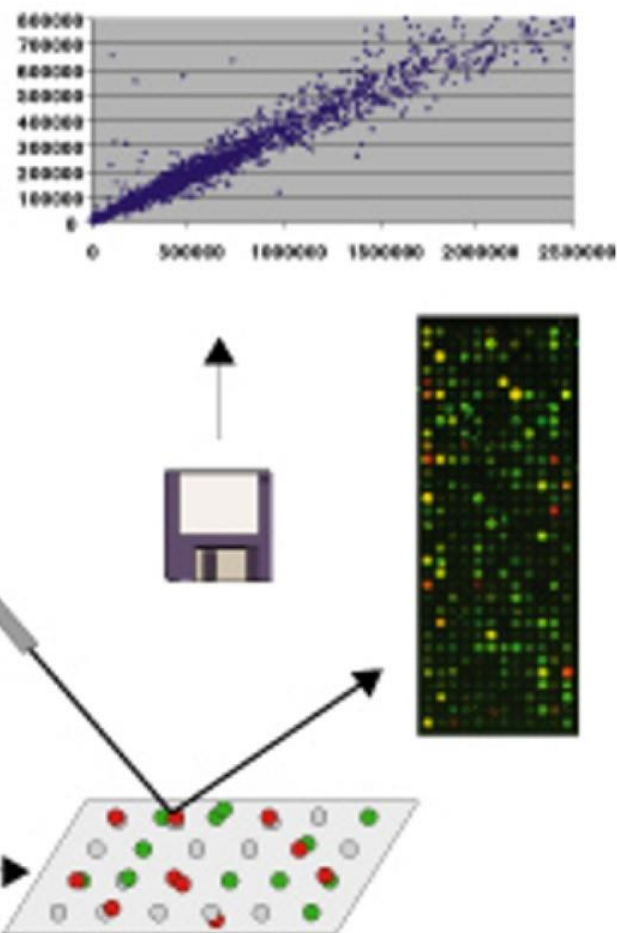
Preparo da amostra



Preparo das sondas

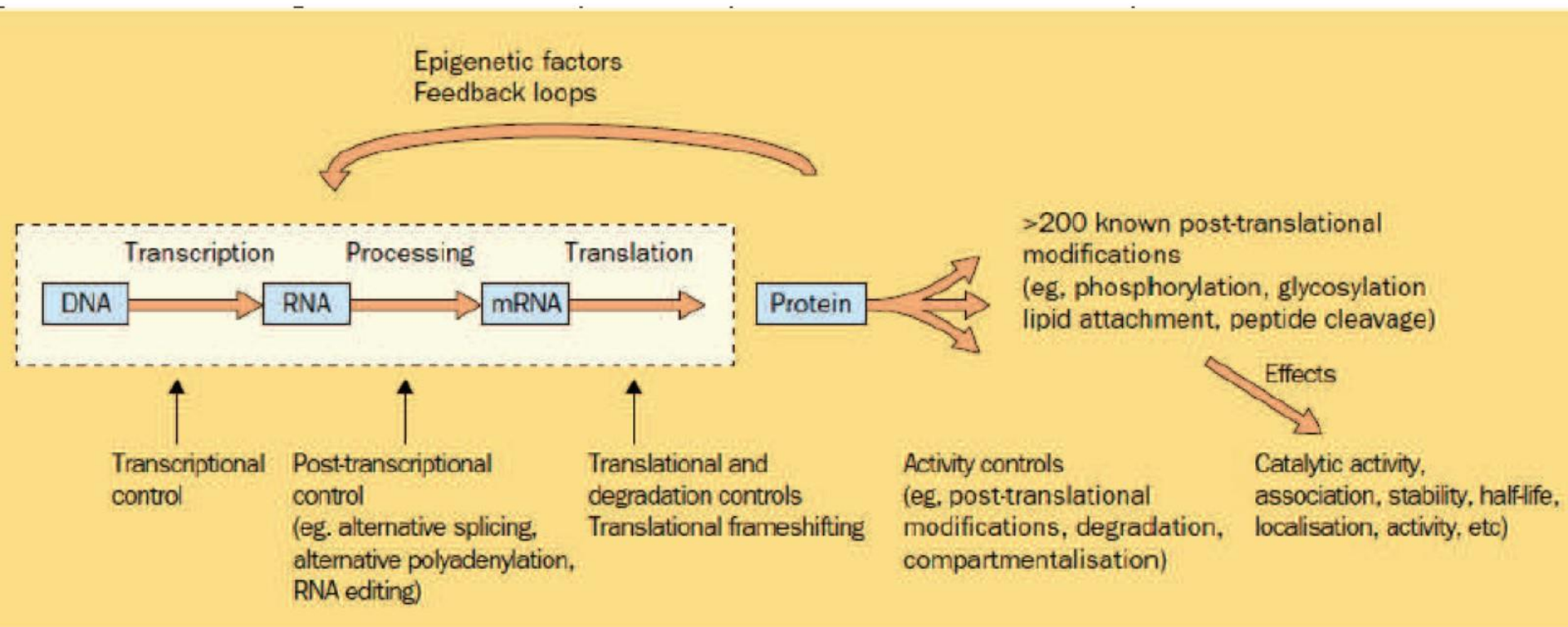


Análise dos dados



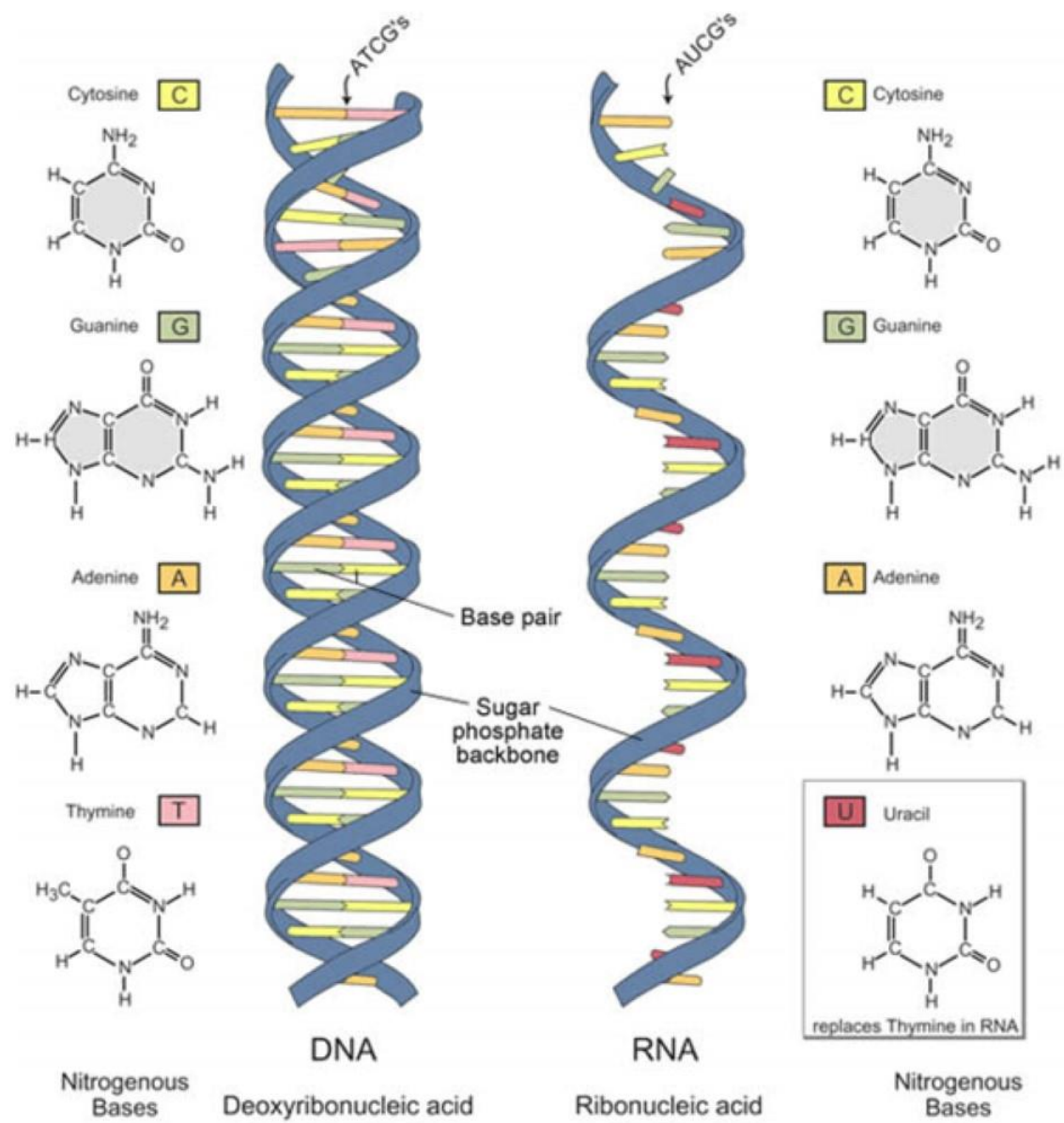


Pós - genômica





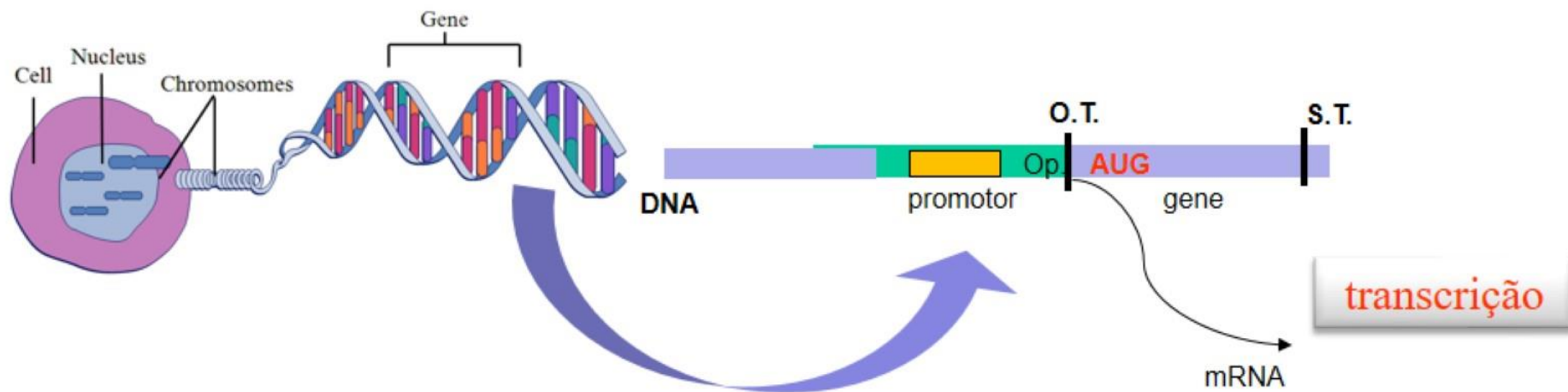
Transcrição do DNA para o RNA





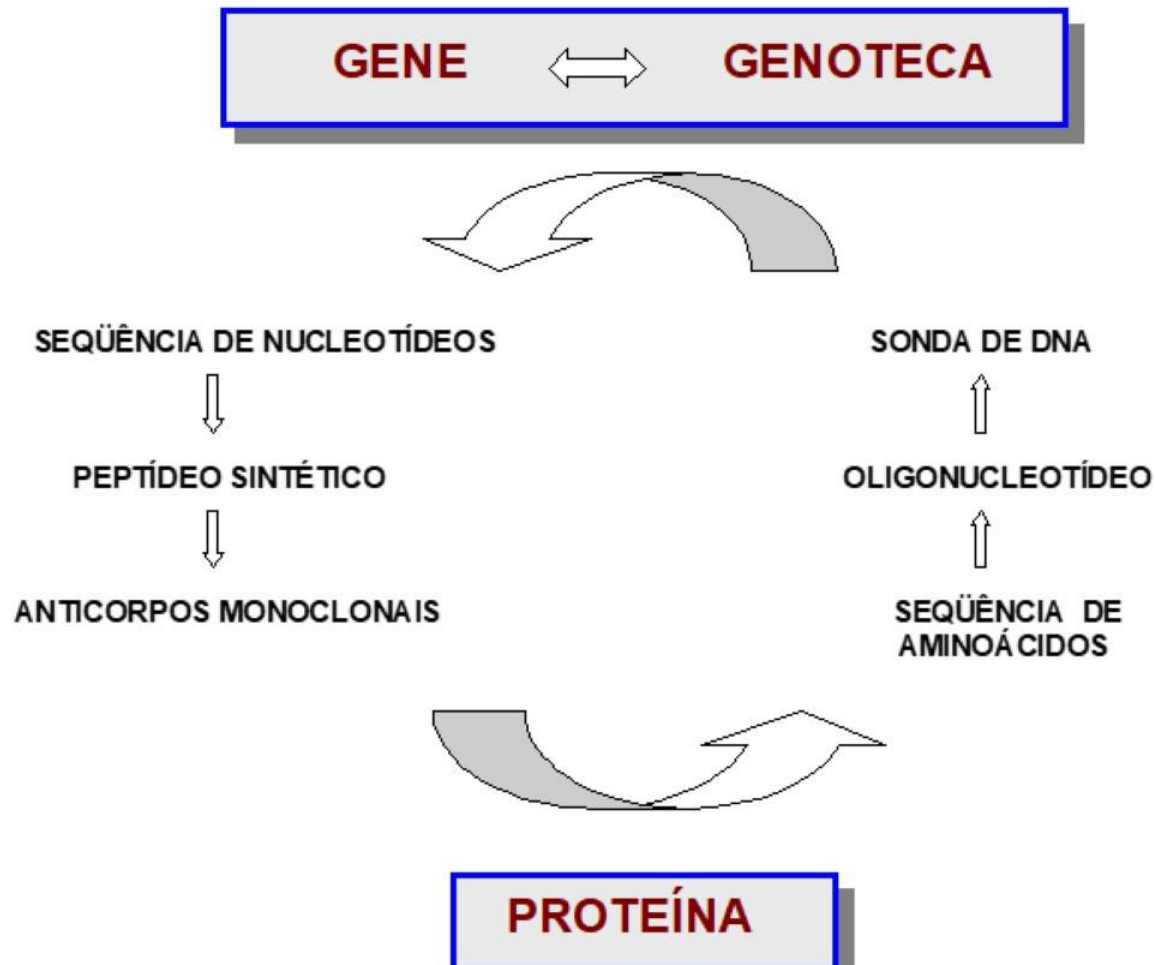
Definição de um G E N E

- ✓ Genética clássica → é a unidade fundamental da hereditariedade.
- ✓ Cada gene é formado por uma sequência específica de nucleotídeos que codifica uma informação genética - proteína.
- ✓ Muitas vezes apresentam são flaqueados por sequências regulatórias como: Promotor, Operador, Origem de Transcrição, Sinal de Terminação.
- ✓ Em células Eucarióticas um gene geralmente inicia coma sequência '**AUG**'





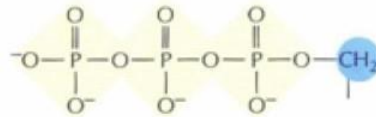
Princípios básicos de Biologia Molecular



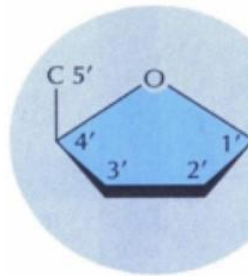


Composição química dos ácidos Nucleícos

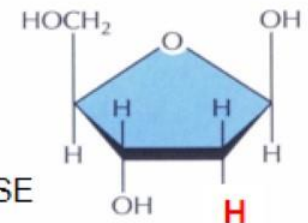
1 FOSFATOS



2 AÇÚCARES (pentose)

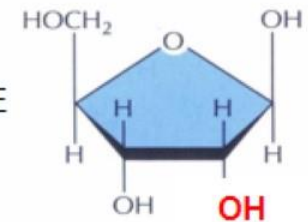


DESOXIRRIBOSE

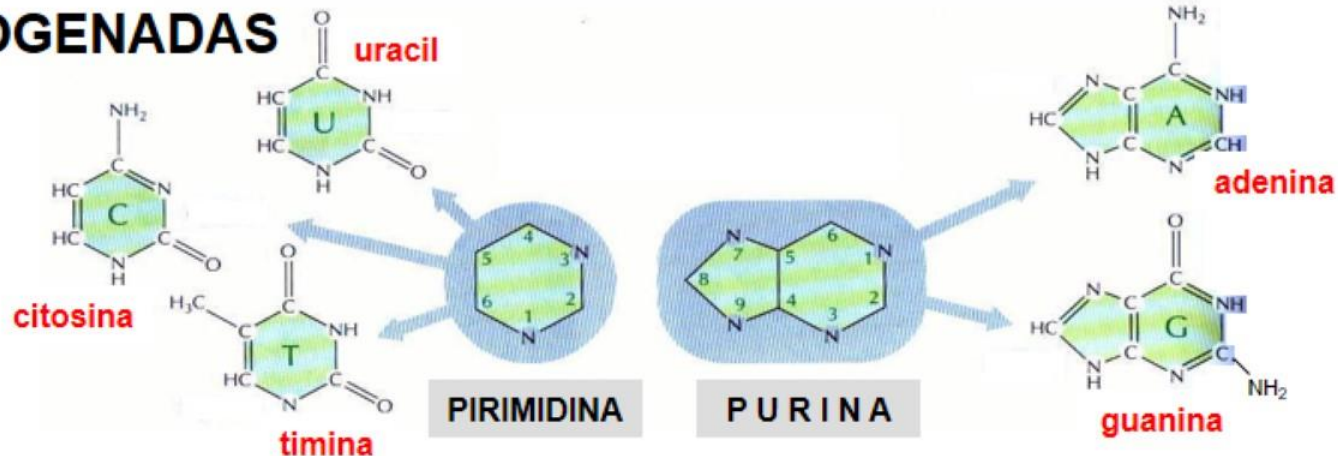


Não hidrolisa
com NaOH

RIBOSE



3 BASES NITROGENADAS





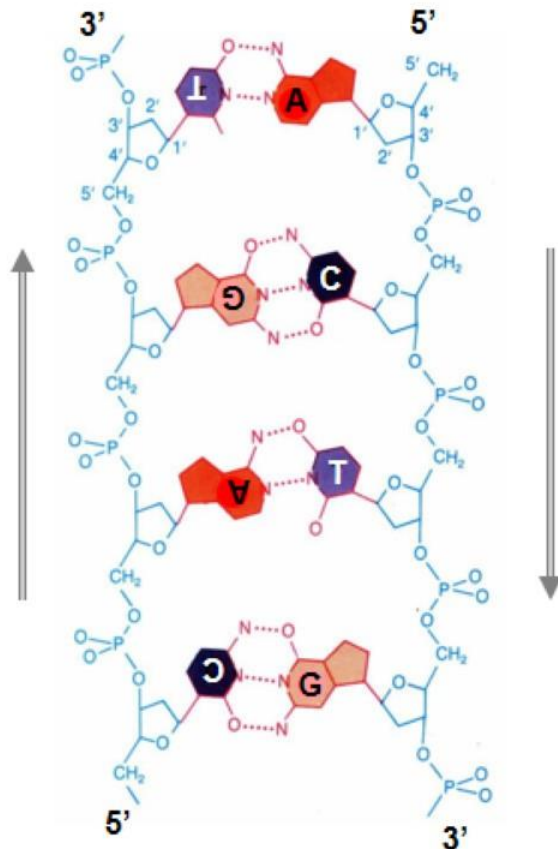
Composição química dos ácidos Nucleícos

PURINAS - A G
PIRIMIDINAS - C T U

Pontes de Hidrogênio

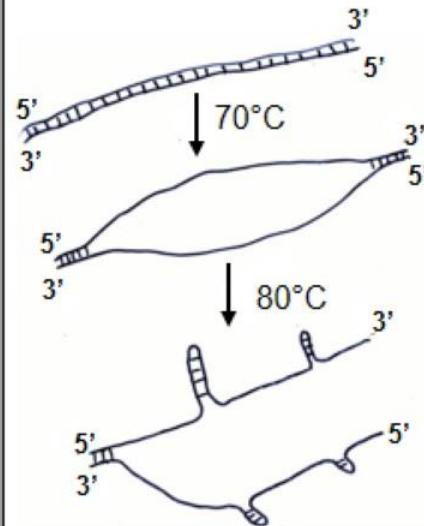
A=T

C≡G

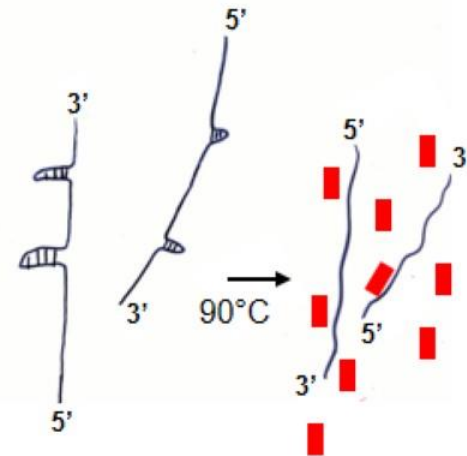


Propriedade físicas e químicas do DNA:

- Viscosidade
- Sedimentação em Gradiente de CsCl (+ CG, + denso)
- Denaturação: Química - pH < 4 ou > 11 (NaOH)
Física - T_m (proporcional ao CG)



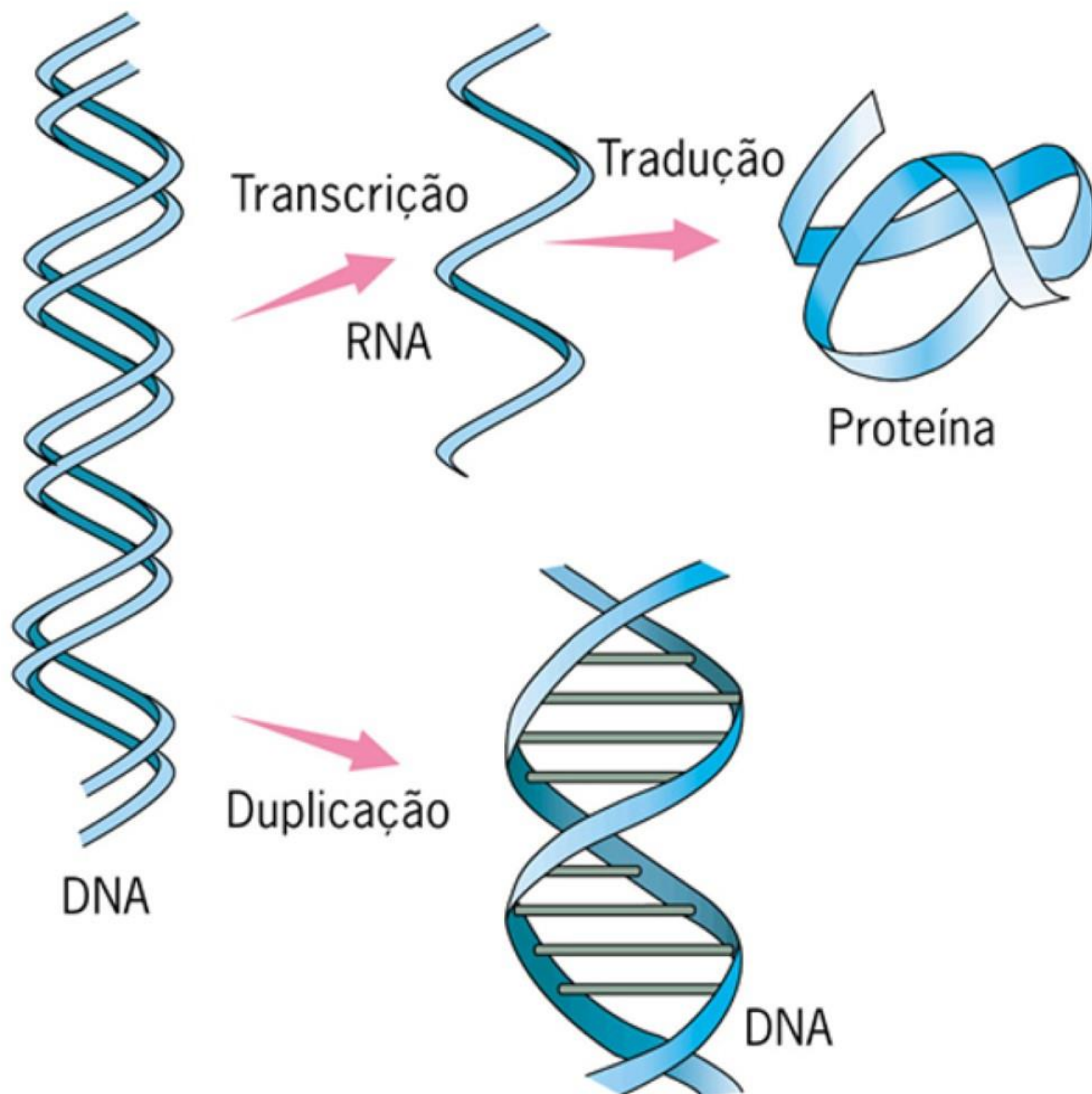
85°C



Hibridização
Estringência



Conceitos básicos de genética clássica

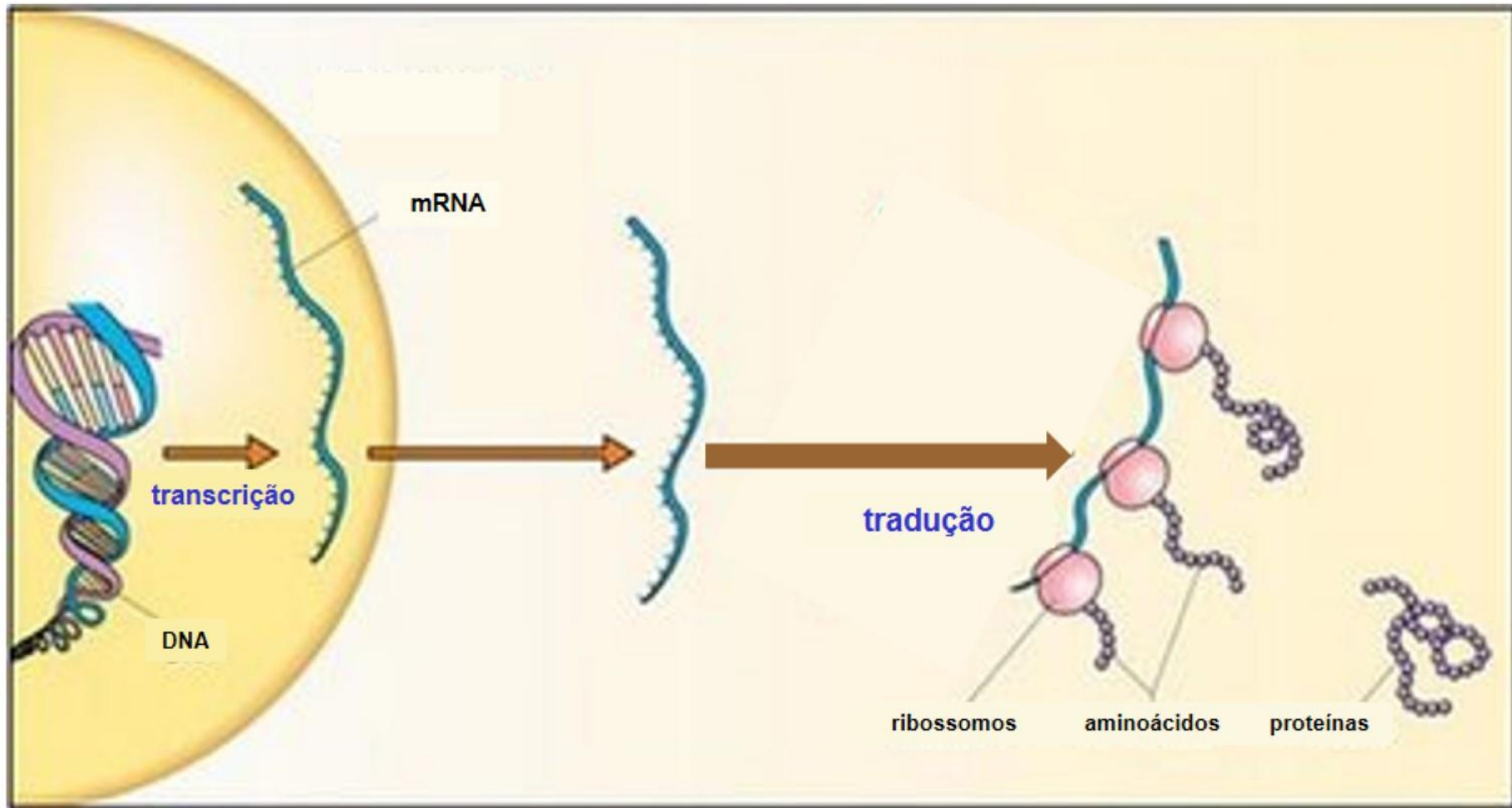




Dogma Central da Biologia Molecular



O DNA pode se replicar e dar origem a novas moléculas de DNA, pode ainda ser transcrito em RNA, e este por sua vez traduz o código genético em proteínas





Transcrição do DNA para o RNA

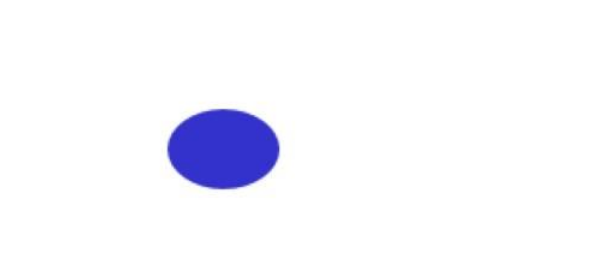
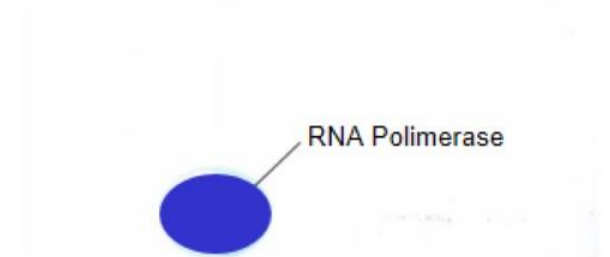
Processo de síntese de RNA a partir de um molde de DNA

Apenas uma fita é transcrita na direção 5' → 3'

Enzima atuante: **RNA Polimerase** (5 unidades)

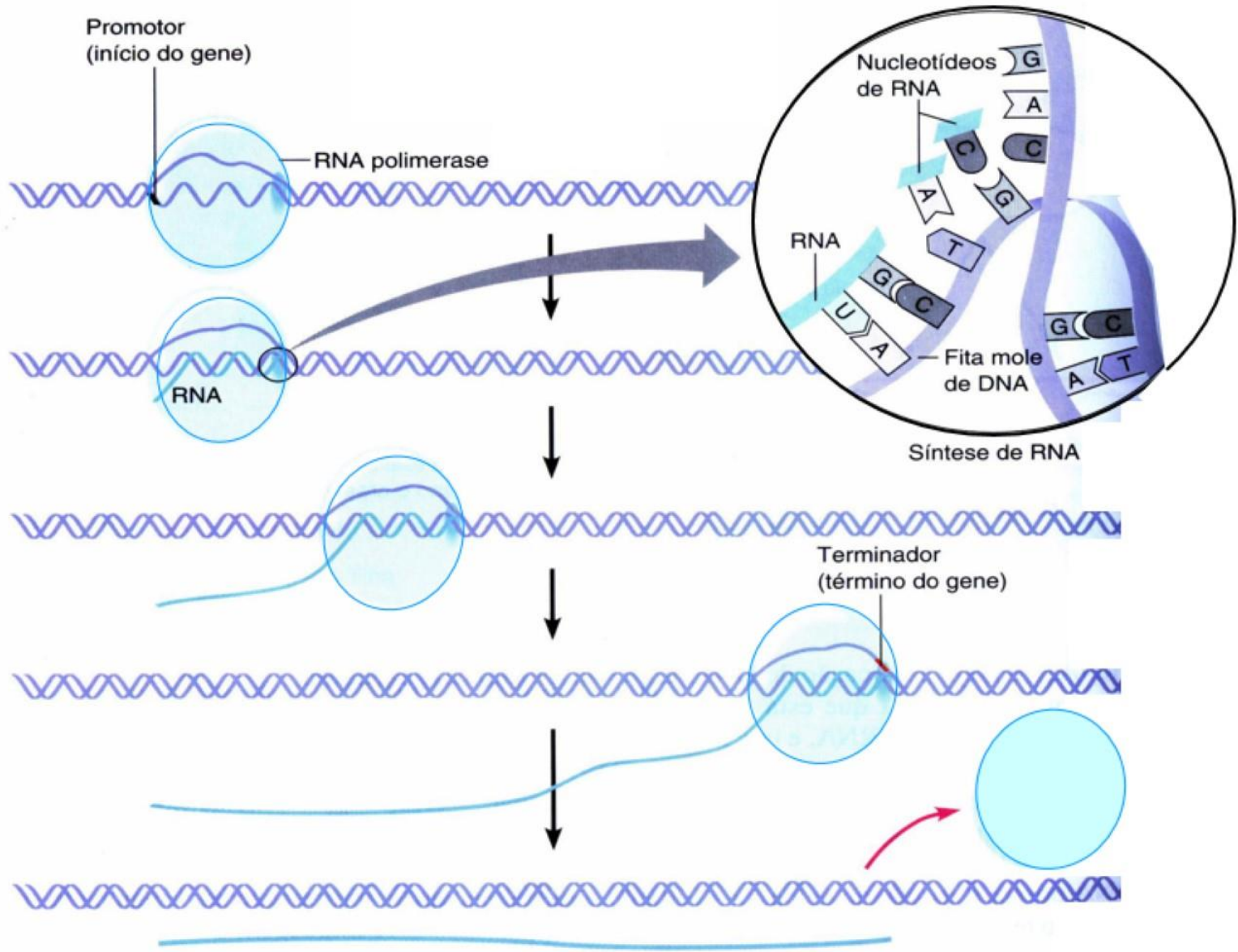
Reconhece os sinais de transcrição no **DNA**:

- Promotor : regiões -35 e -10 (TATA box)
- Operador : Op. (regulação gênica)
- Origem de Transcrição : AUG (metionina)
- Terminação - região rica em GC + AAAAAA..
- fator *rho*





Transcrição do DNA para o RNA



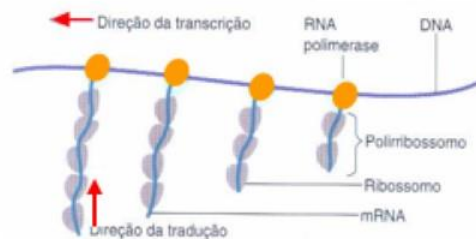


Transcrição do DNA para o RNA

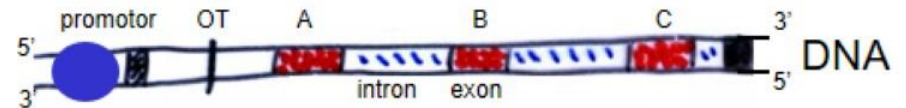
policistrônico



Cél Eucariótica
bactérias

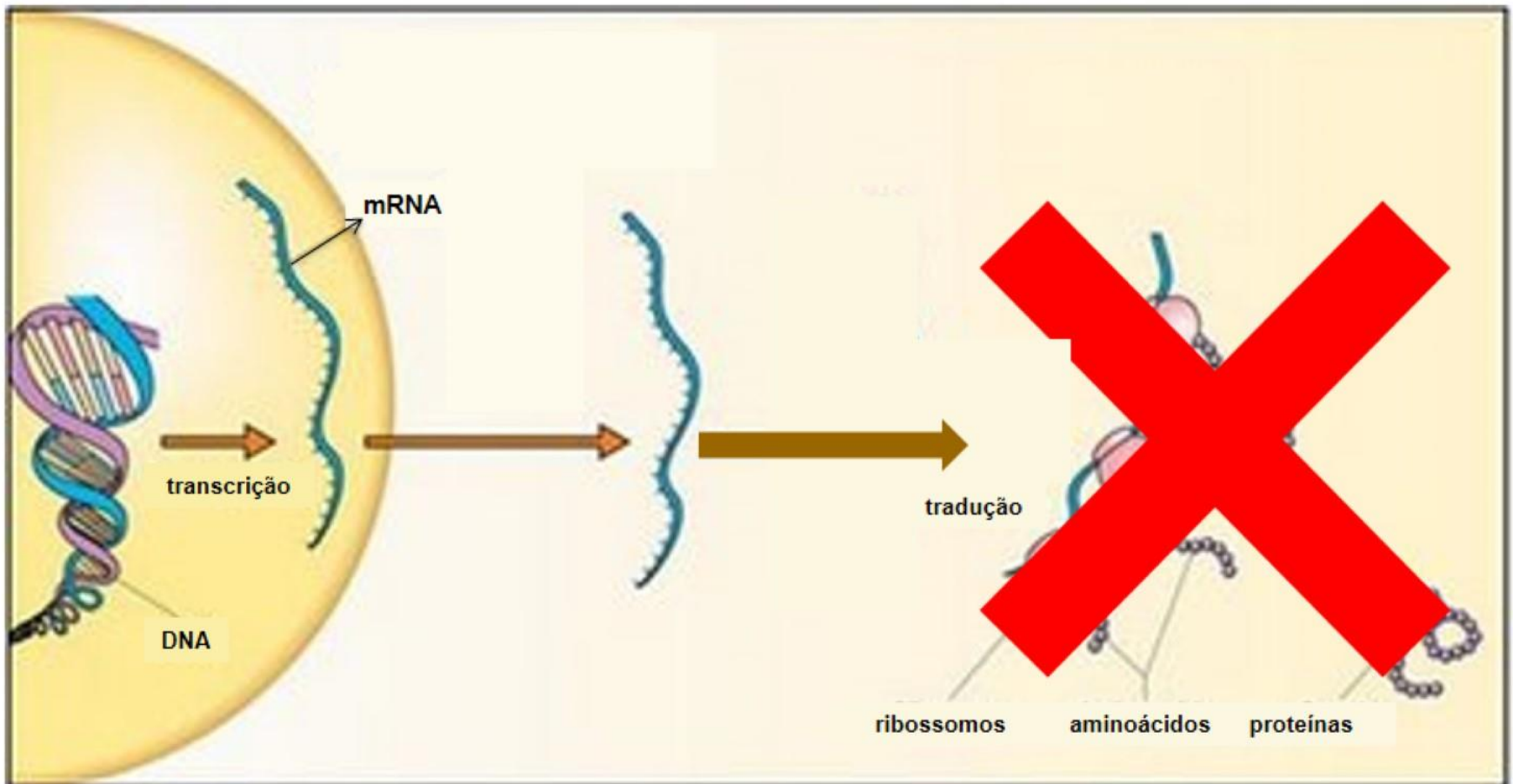
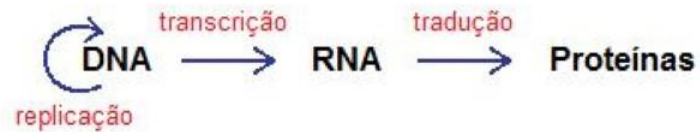


monocistrônico





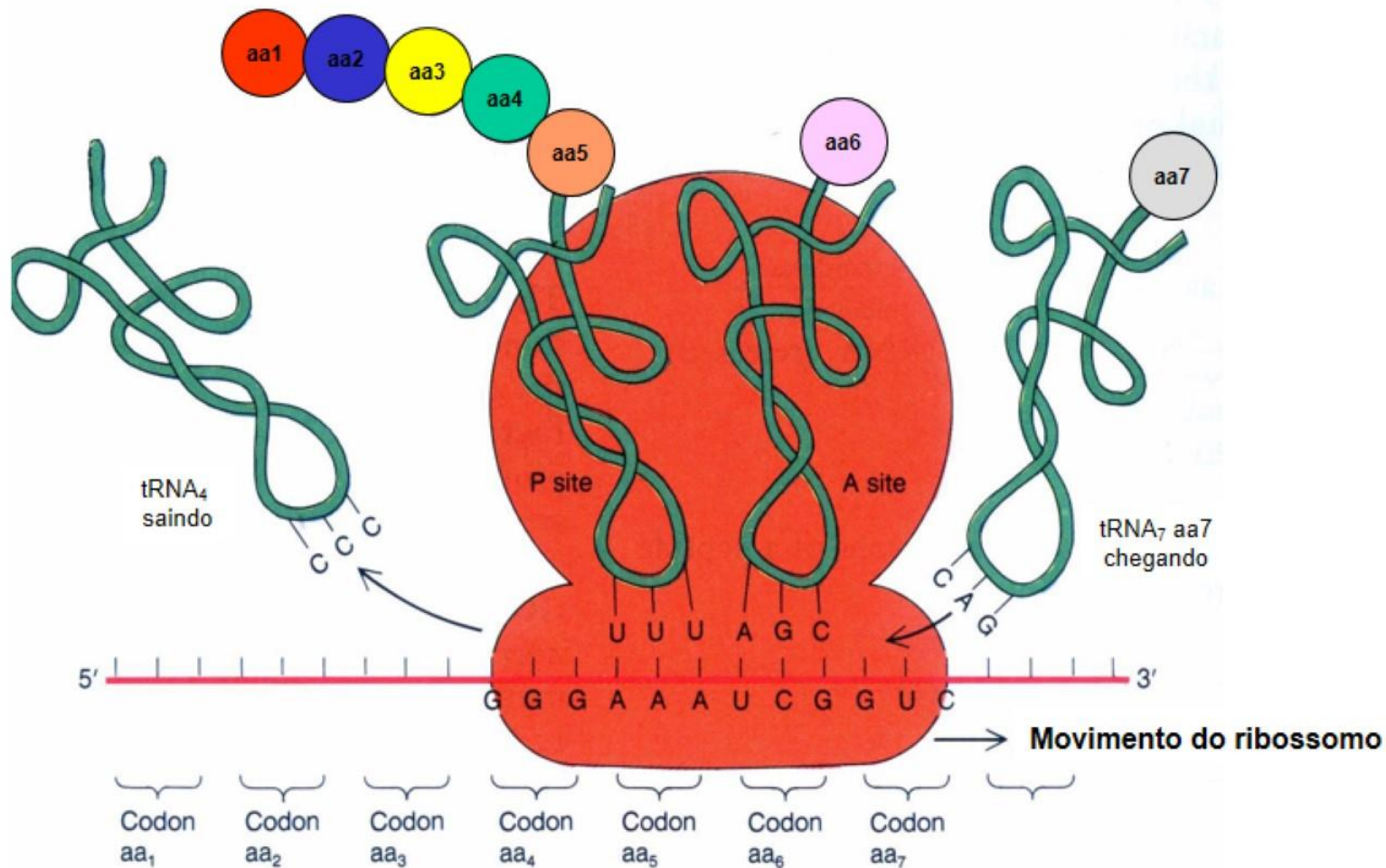
Inibição da tradução - RNAi





Tradução do RNA para a proteína

dogma genetico





Tradução do RNA para a proteína

2a

1a

3a

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } <u>UAA Stop</u> <u>UAG Stop</u>	UGU } Cys UGC } <u>UGA Stop</u> <u>UGG Trp</u>	U C A G
C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG <u>Met</u>	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G