

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:

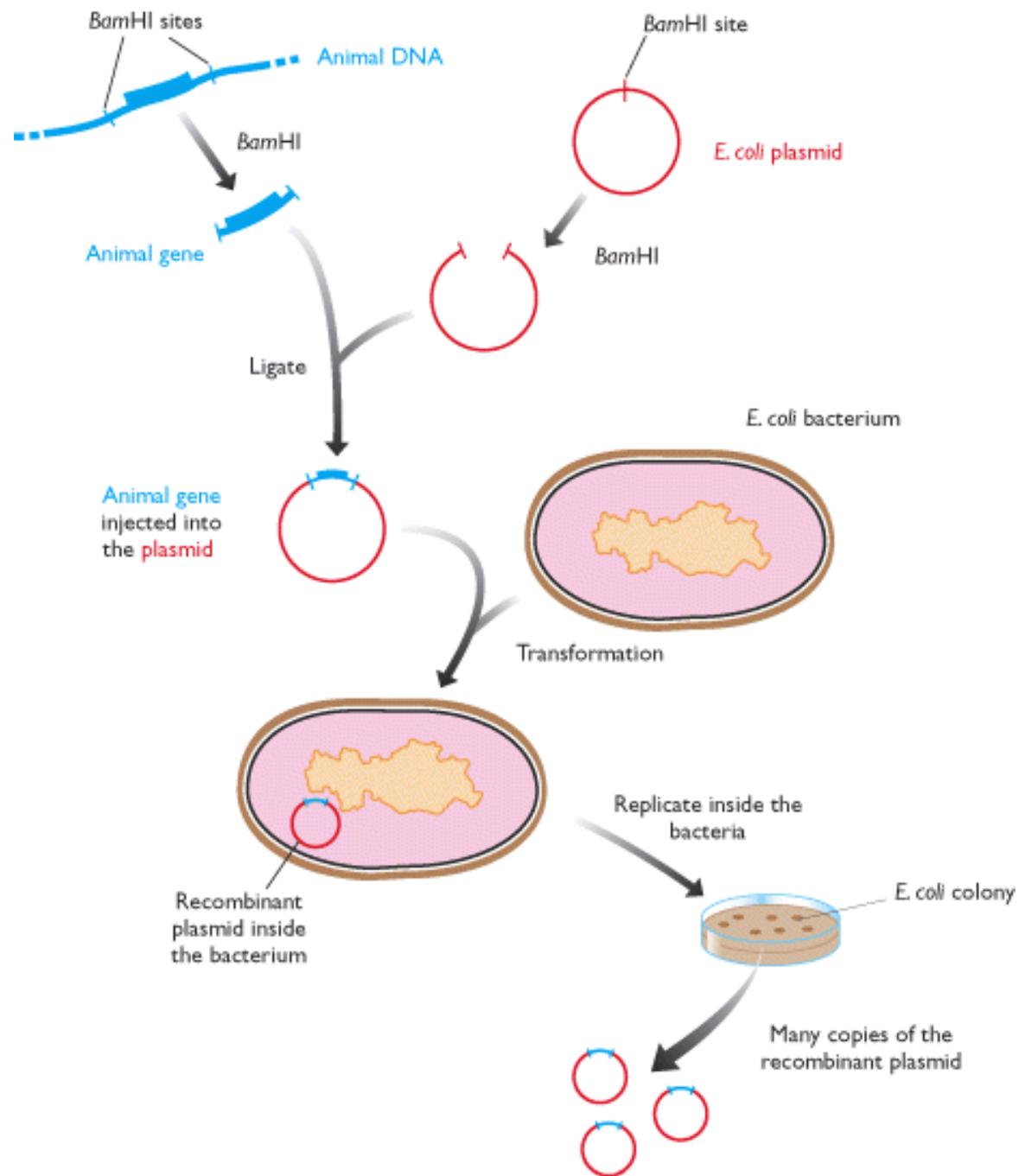
- Sexo – barreira específica (espécie)
  - Conjugação – troca de material genético em bactérias
  - Transdução – troca de material genético por fagos (vírus)
  - Transferência horizontal
- 
- 1970s – DNA Recombinante – rompeu barreiras de espécies



# 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



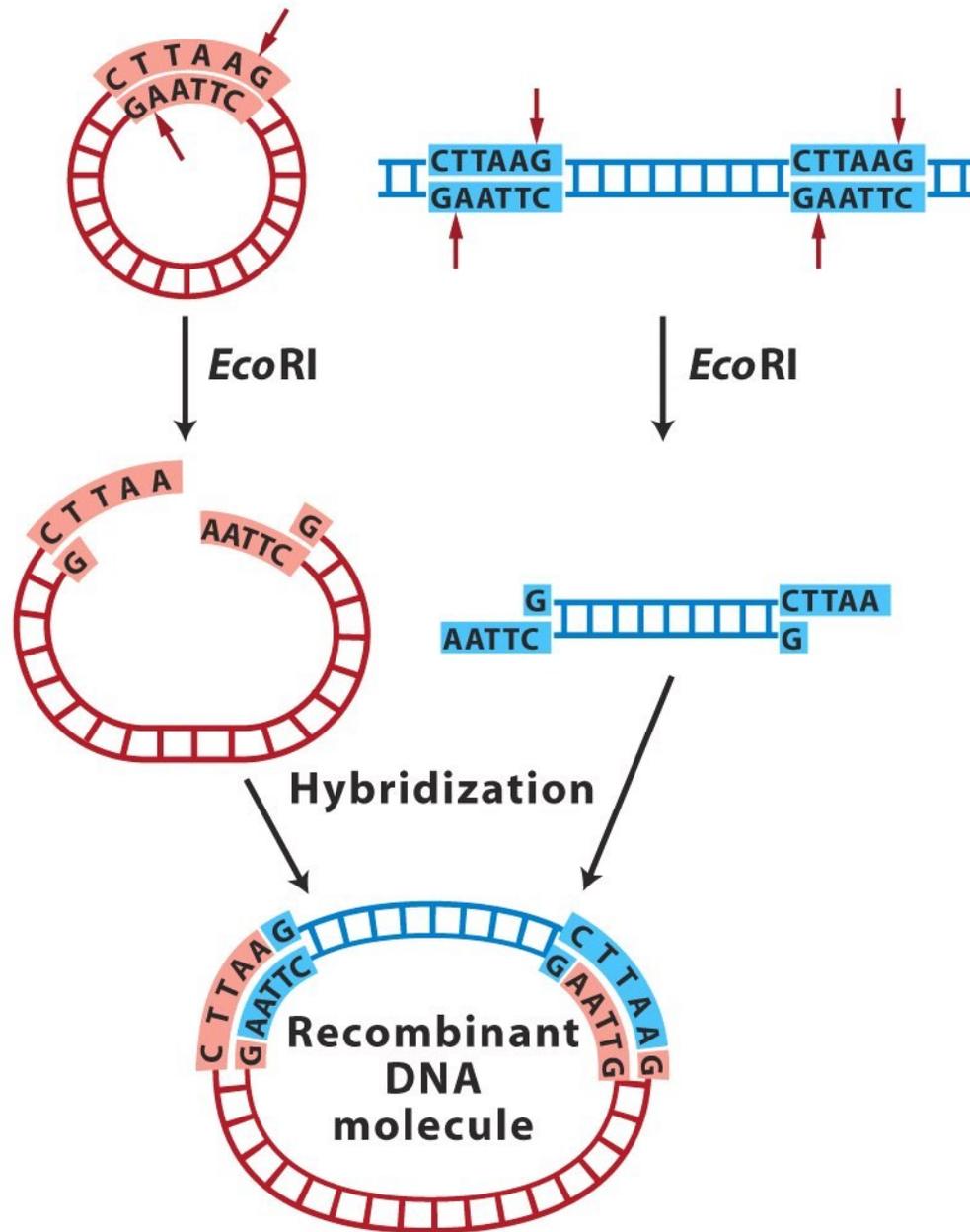
# Tecnologia do DNA Recombinante

## 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

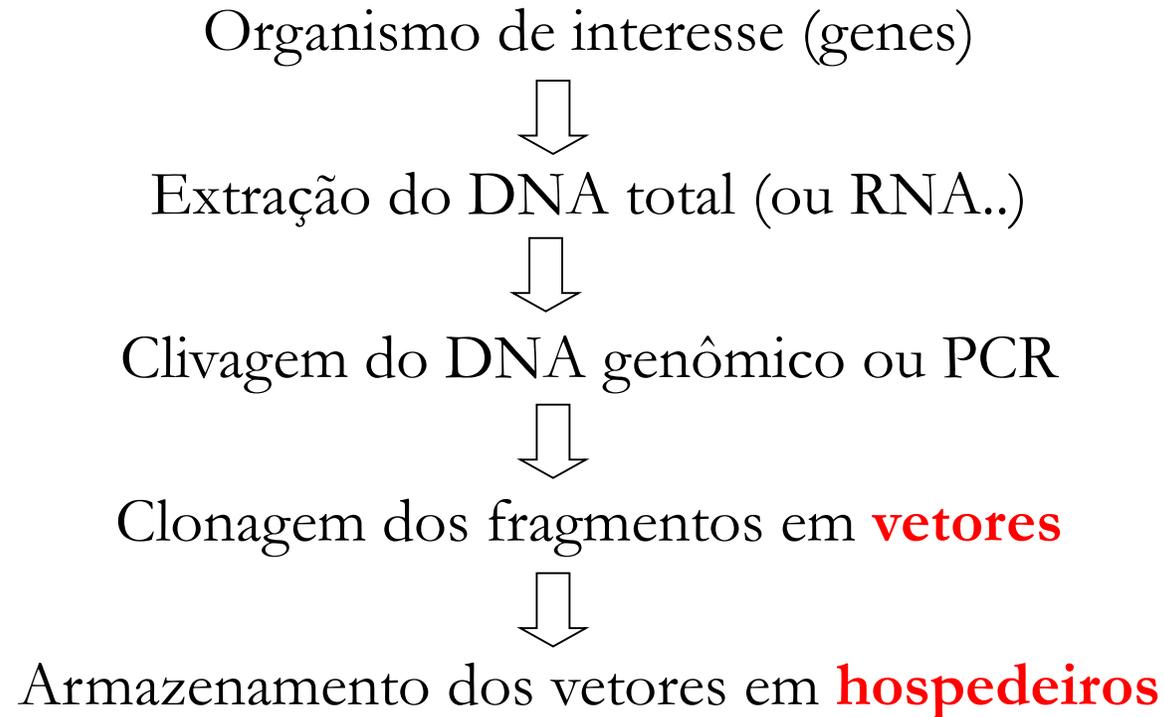
- Enzimas de restrição -  **corte**
- Ligases -  **ligação**
- DNA Polimerases -  **síntese**
- Quinases e fosfatases -  **modificação de terminações** (alteração de  $\text{PO}_4^-$ )



Formação de uma  
molécula de  
DNA recombinante

# Tecnologia do DNA Recombinante

## Como fazer um DNA recombinante?



# Atores no DNA Recombinante

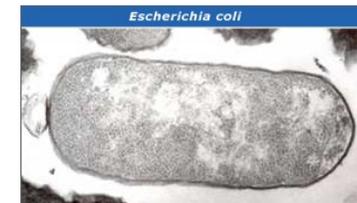
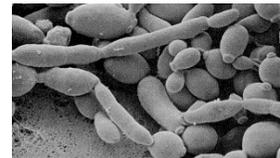
**Enzimas:**      **enzimas de restrição**  
**DNA ligase**

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



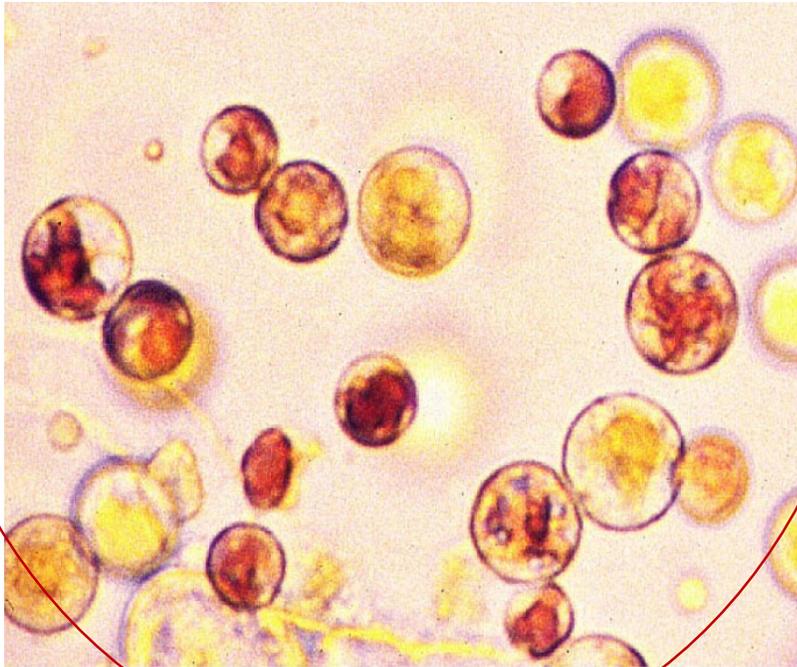
**Hospedeiros:** ***Escherichia coli***

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

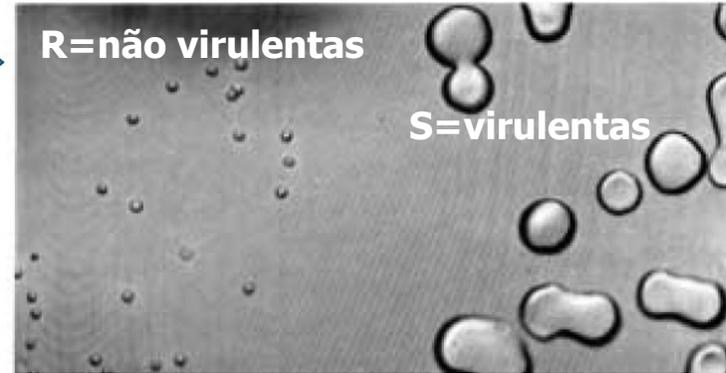
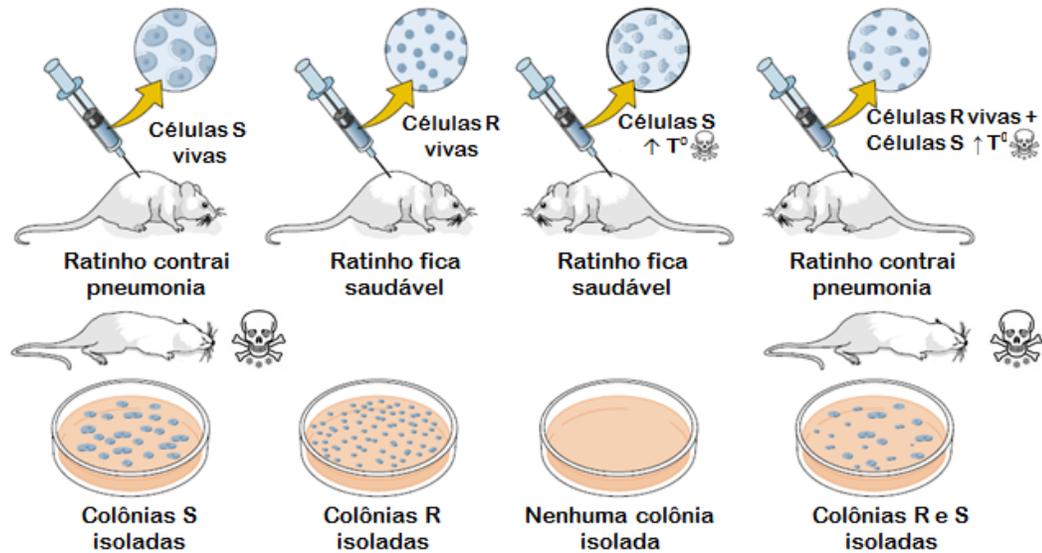
Como chegamos até a tecnologia do  
DNA Recombinante?

# 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



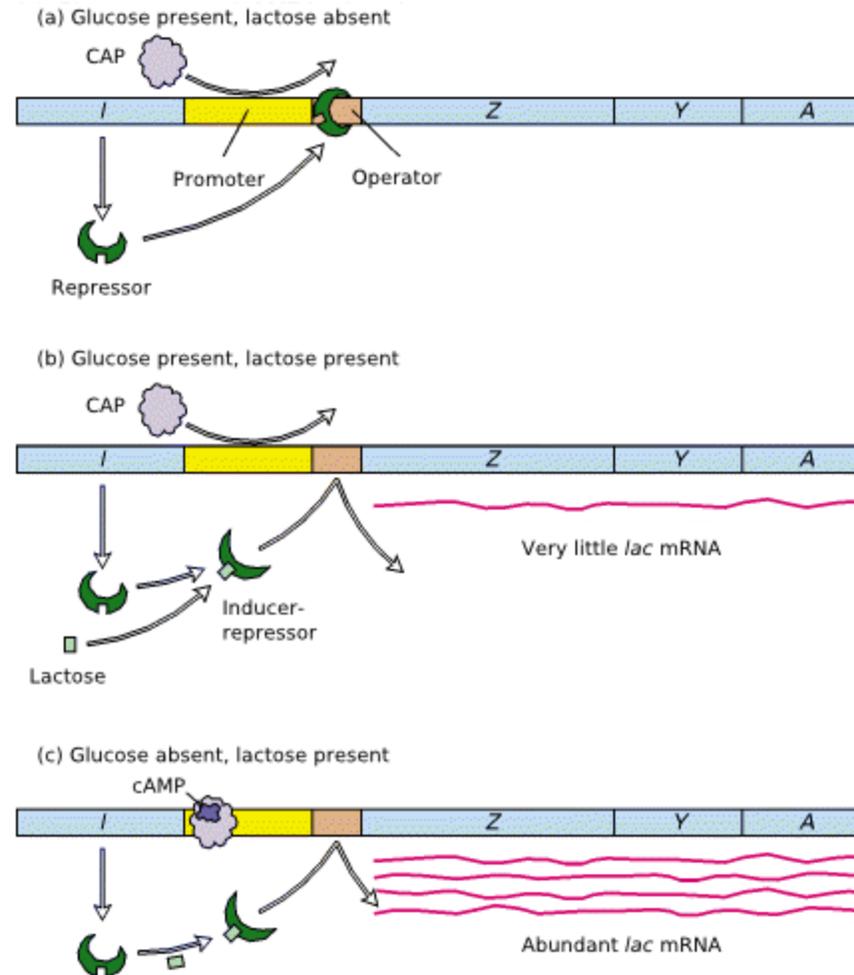
Material genético das bactérias virulentas (mortas) foi responsável pela transformação das bactérias não virulentas (vivas)

## 1944 - Oswald Avery, Collin MacLeod & MacLyn McCarthy

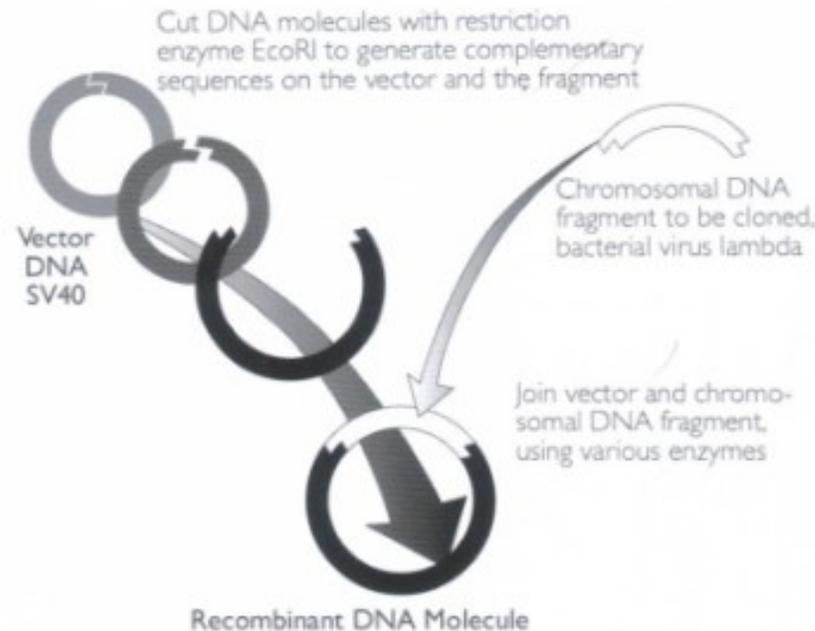
- A atividade de transformação das células S **não é destruída pelo calor**
- A atividade de transformação das células S **não é destruída por proteases ou RNases**
- A atividade de transformação das células S **é destruída por DNases**

**PRINCÍPIO TRANSFORMANTE -> DNA**

**1961: François Jacob e Jacques Monod** estudaram o processo de síntese de proteínas em células de bactérias e descobriram que o principal responsável por essa síntese é o DNA



**1972: Paul Berg** realizou a primeira experiência bem sucedida onde foram ligadas duas cadeias genéticas diferentes: uma cadeia de DNA do **fago  $\lambda$**  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 Natl 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

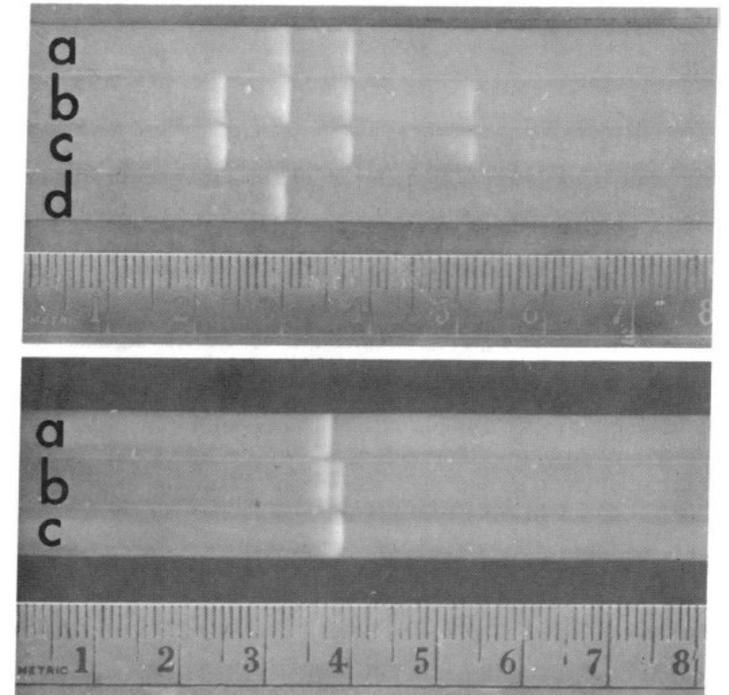
*Communicated by Norman Davidson, July 18, 1973*

**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

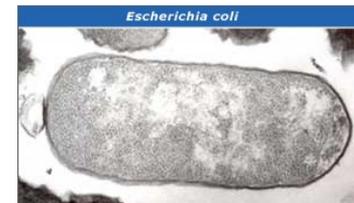
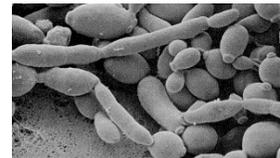
**Enzimas:**      **enzimas de restrição**  
                     **DNA ligase**

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



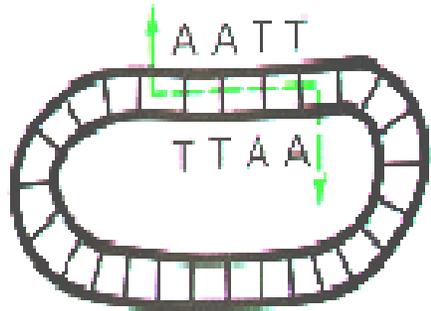
**Hospedeiros:** ***Escherichia coli***

leveduras  
células animais  
células vegetais  
células de insetos,..



# Construção de DNA Recombinante

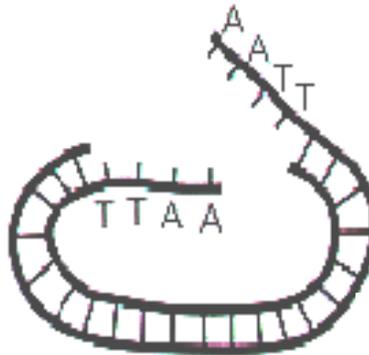
Molécula de DNA de um plasmídeo **circular**



Clivagem com enzima de restrição



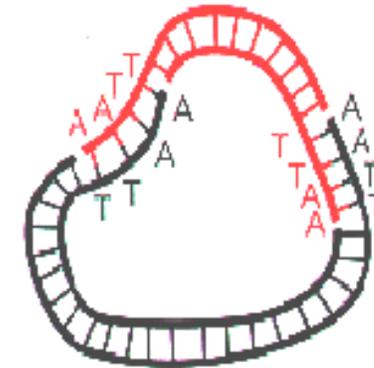
Molécula de DNA de um plasmídeo **linear** com extremidades coesivas



DNA exógeno



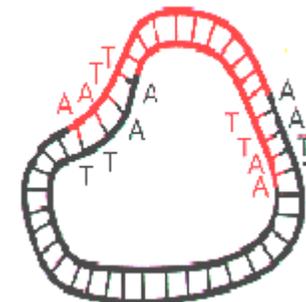
Ligação covalente pela DNA ligase



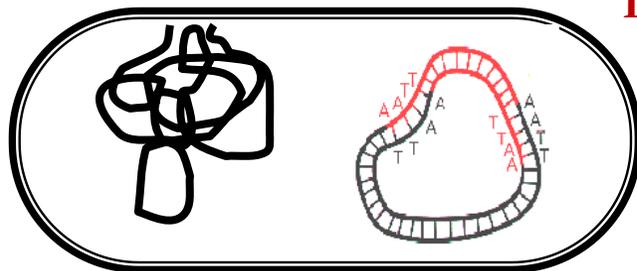
Inserção em uma célula hospedeira



Molécula de DNA plasmidial contendo o **inserto**



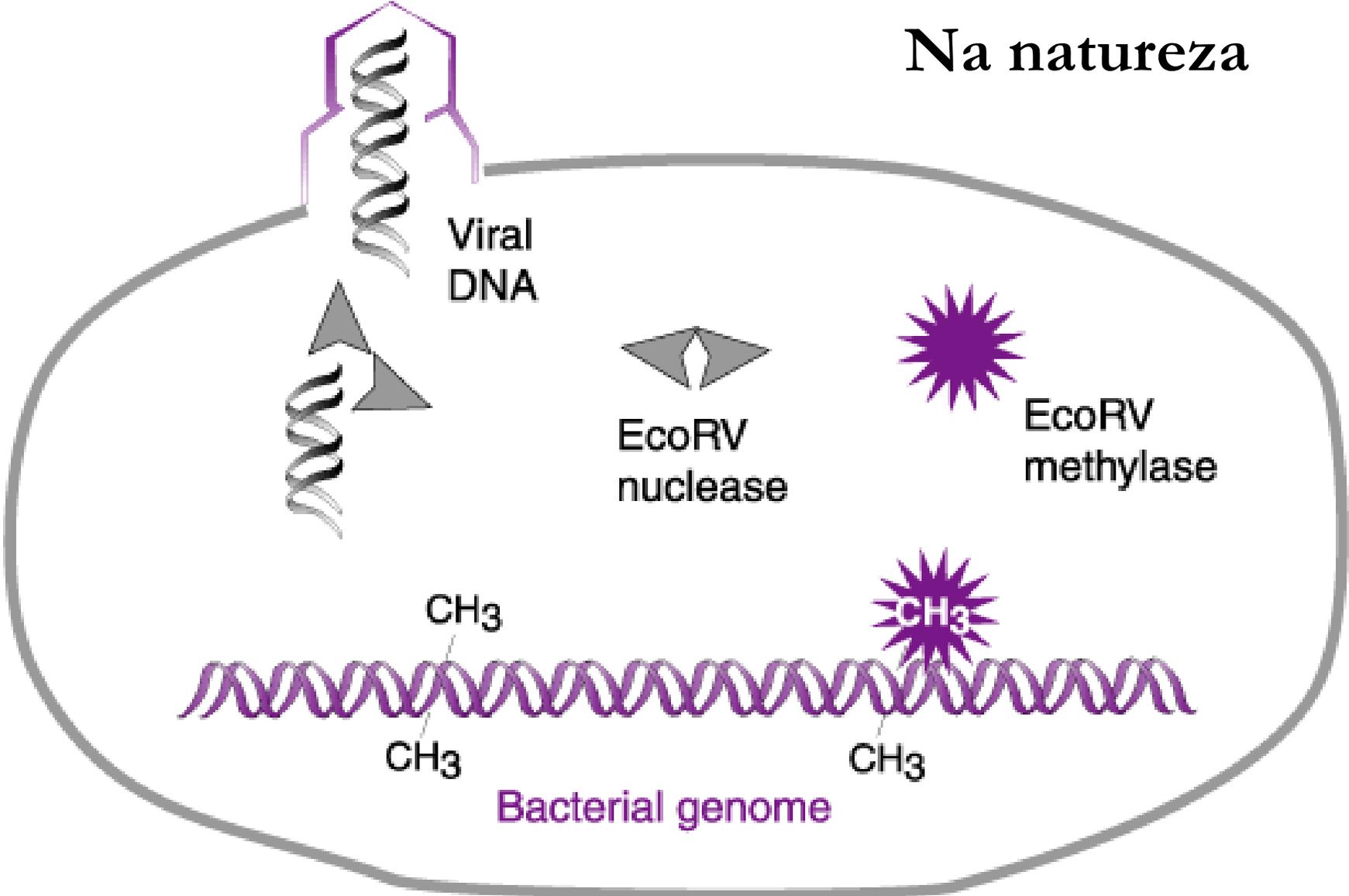
Transformação



# 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<sup>a</sup> endonuclease de restrição
- 1970 - purificação e caracterização *Hin* dII
  - corte mesmo sítios - mapa de restrição *Simian Virus* 40 (SV40)

# Na natureza



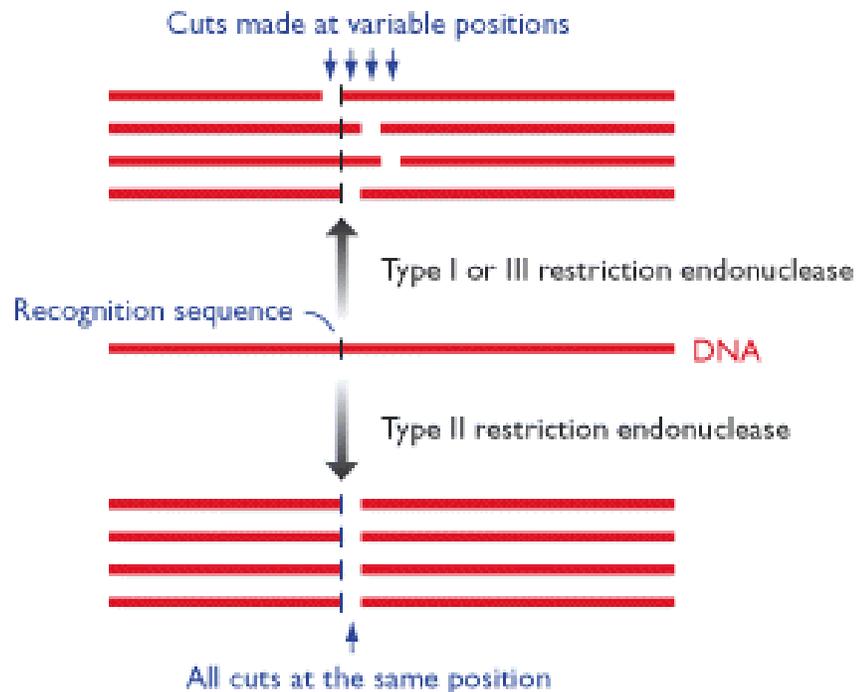


# Características de Enzimas de Restrição

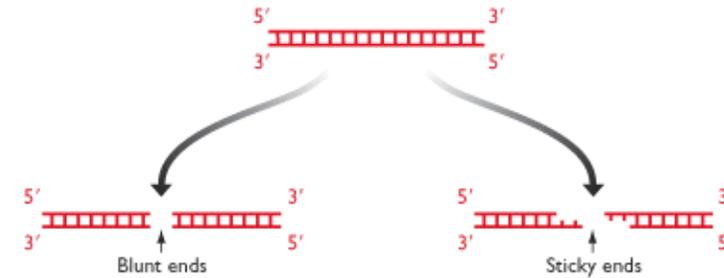
- Enzimas de restrição são endonucleases;
- Enzimas pp. de bactérias
- Diferentes linhagens de bactérias expressam enzimas de restrição
- O nome da enzima é derivado do nome da linhagem e espécie bacteriana em que foi isolada
- Cortam (hidrolisam) DNA em fragmentos definidos e reproduzíveis
- Ferramenta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

# Tipos de Terminação

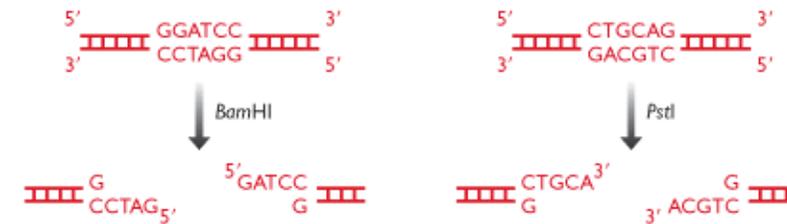
## Tipos de Enzimas de Restrição



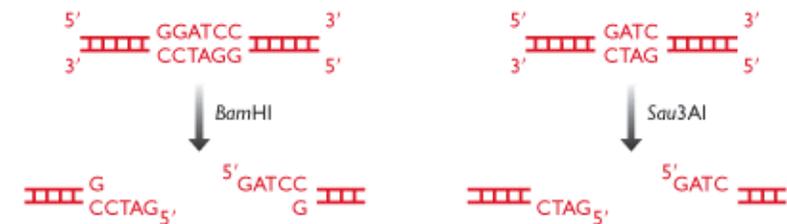
(A) Blunt and sticky ends



(B) 5' and 3' overhangs



(C) The same sticky end produced by different enzymes

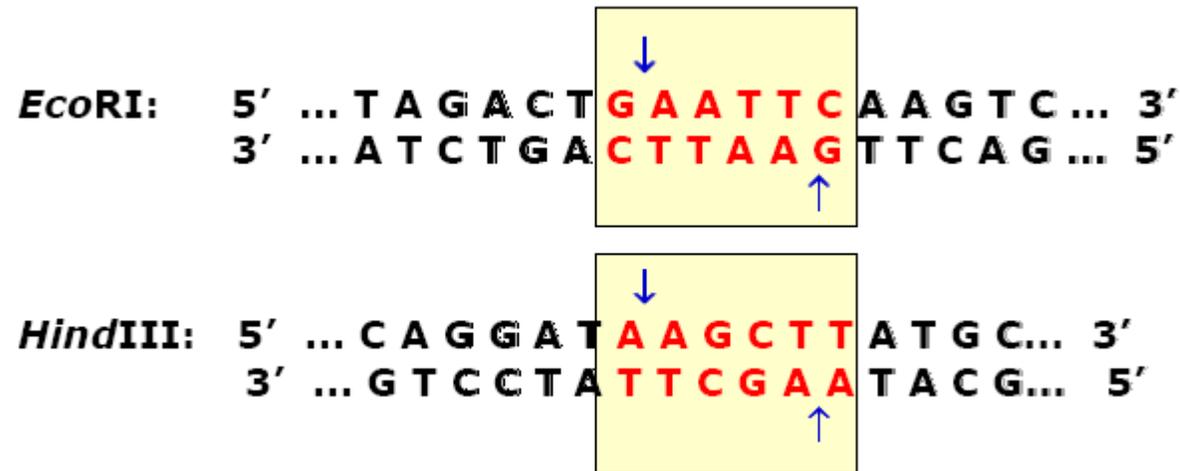


Extremidade coesiva

Extremidade cega

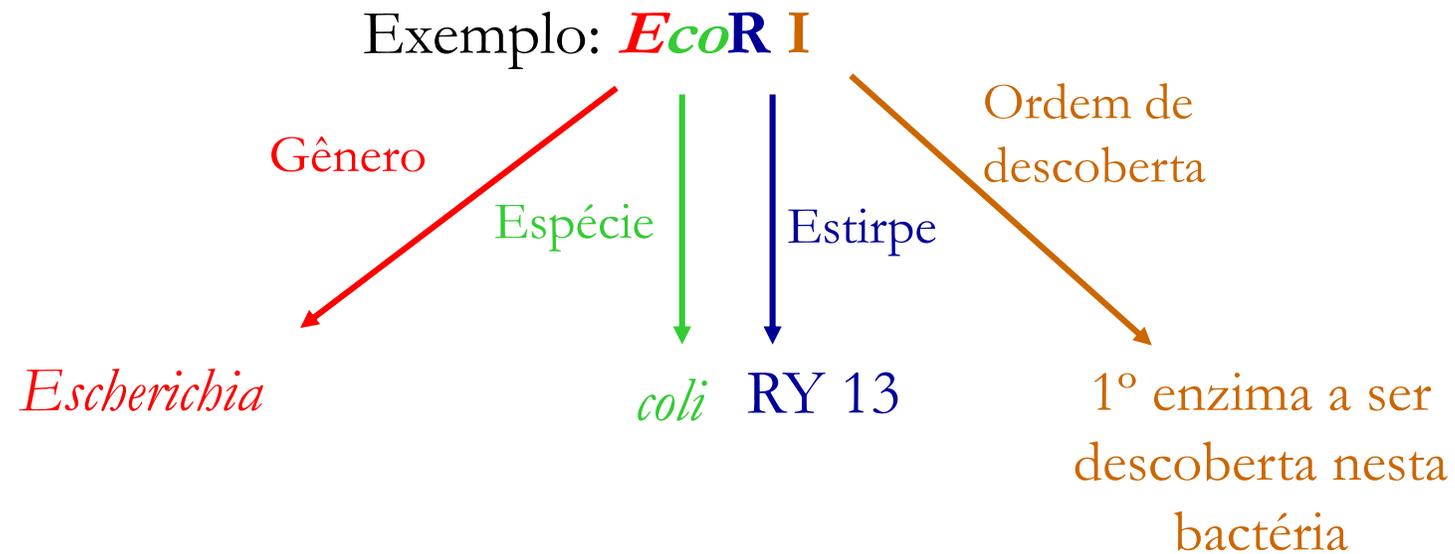
# Enzimas de Restrição

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



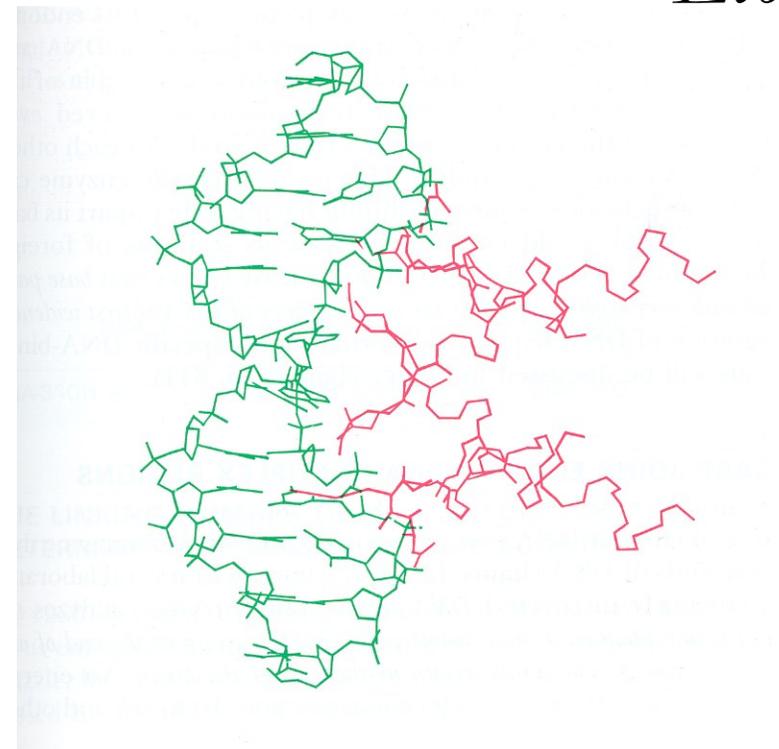
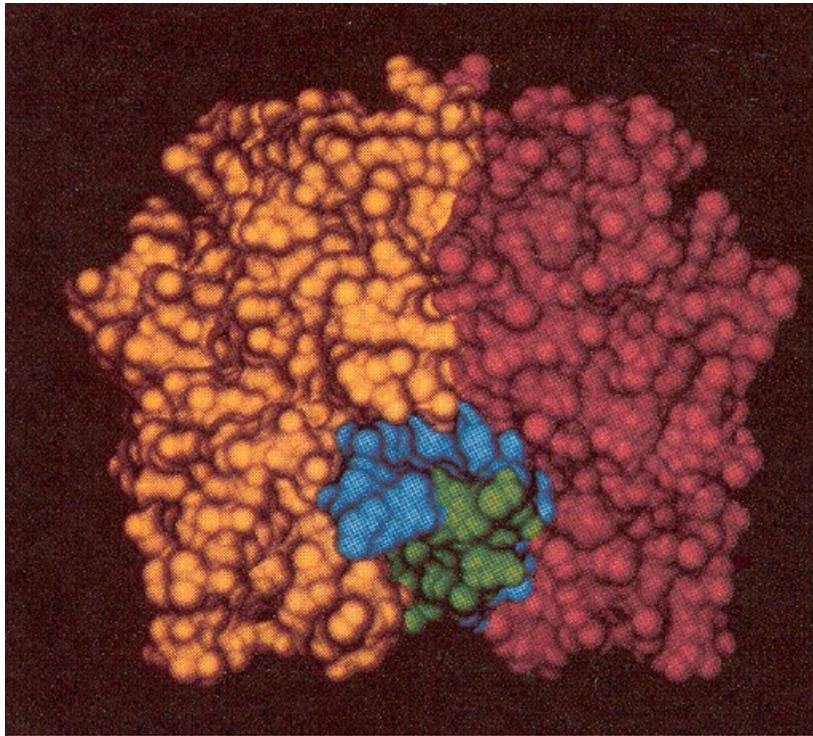
# Nomenclatura

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



# Enzimas de Restrição

*EcoRI*



Enzimas de restrição

# 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 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

**REBASE<sup>®</sup>**  
The Restriction Enzyme Database  
<http://rebase.neb.com> - [CITING REBASE...](#)

Choose search category and enter keyword:  
use percent sign as wildcard and quotes around phrases

author starting with

enzyme name or #:

**REBASE** sequence data

REBASE Submit Data

**REBASE** PacBio

REBASE Genomes

REBASE Tools

REBASE search..

REBASE Suppliers

REBASE FILES

REBASE HELP

Subscribe to REBASE

REBASE Services

REBASE Related Sites

REBASE NEWS  
Latest References  
Enzyme Discoveries

REBASE Lists

REBASE Enzymes

REBASE Crystal Data

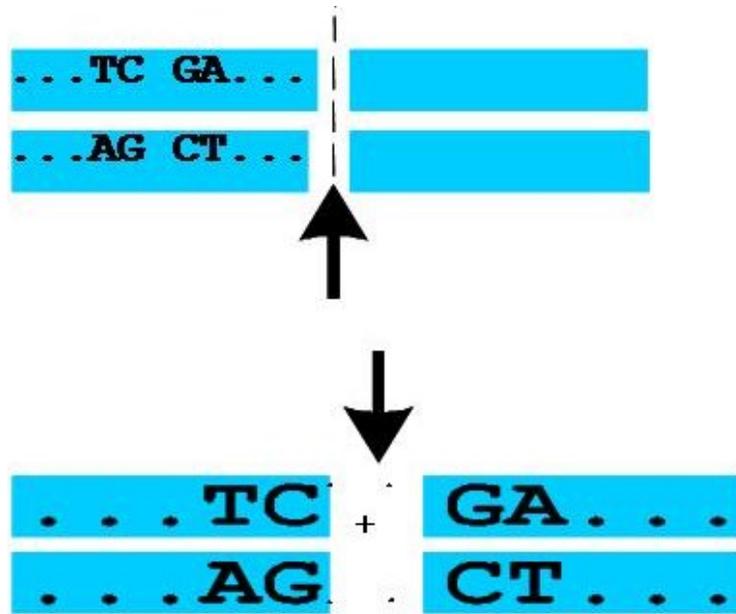
REBASE METHYLATION SENSITIVITY

NEWEST ENZYMES IN REBASE

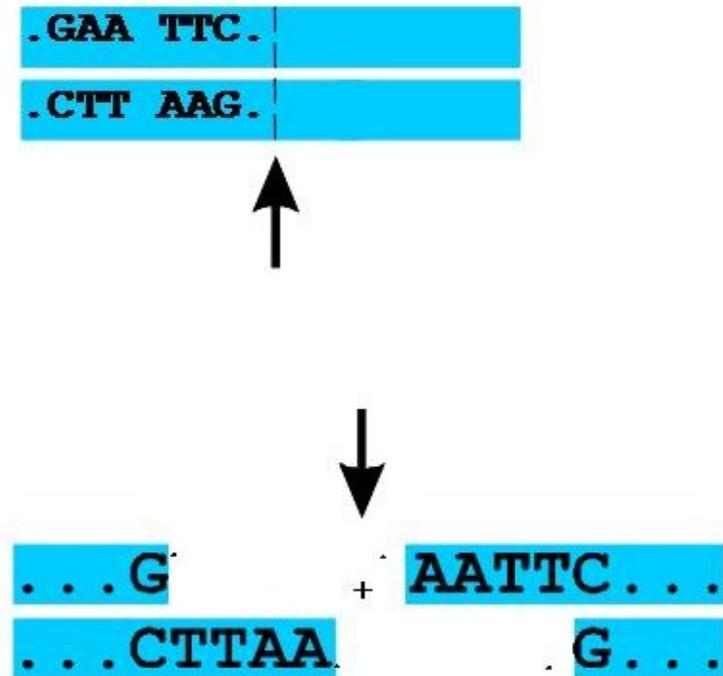
Dr. Richard J. Roberts and Dana Macaluso

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

# Tipos de Cortes



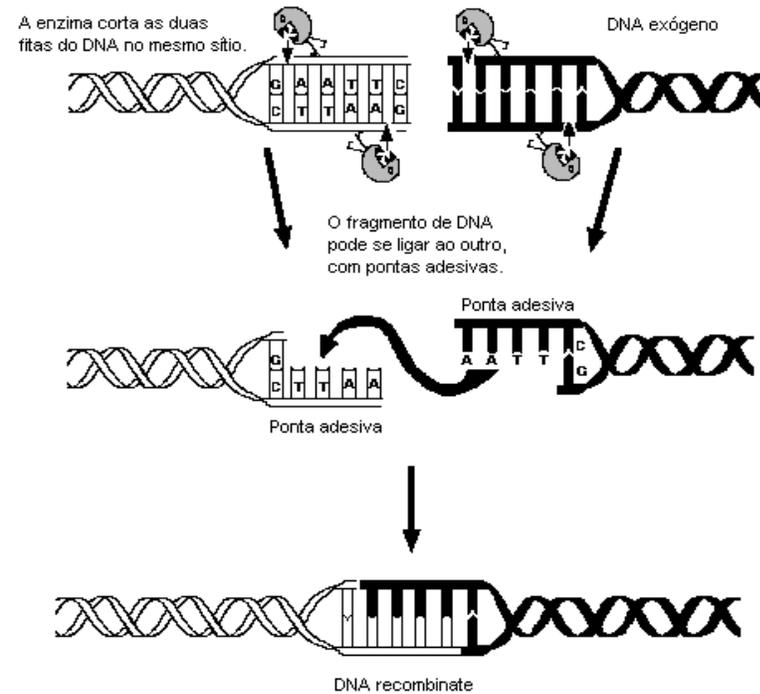
Moléculas com extremidades cegas



Moléculas com extremidades coesivas

# E assim se recombina DNA...

Enzima de Restrição  
Ação da EcoR1



Mas como ele é mantido e multiplicado???

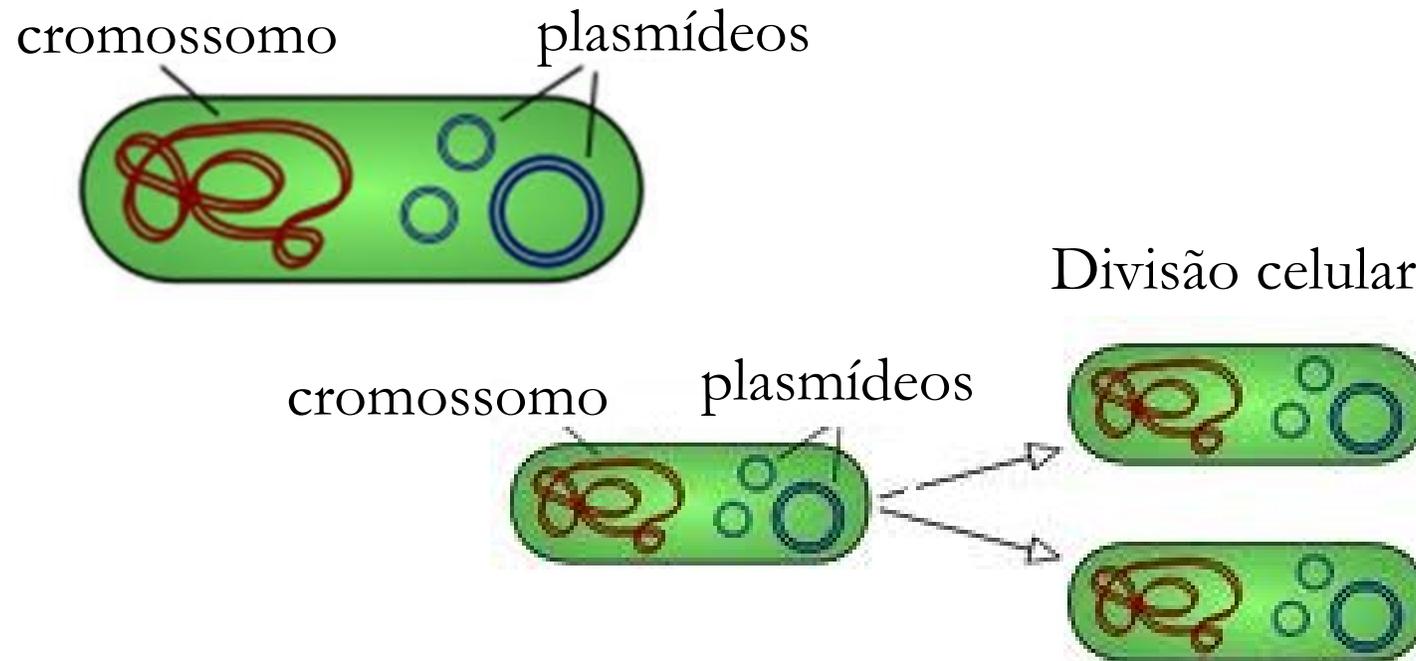
# Vetores de clonagem

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

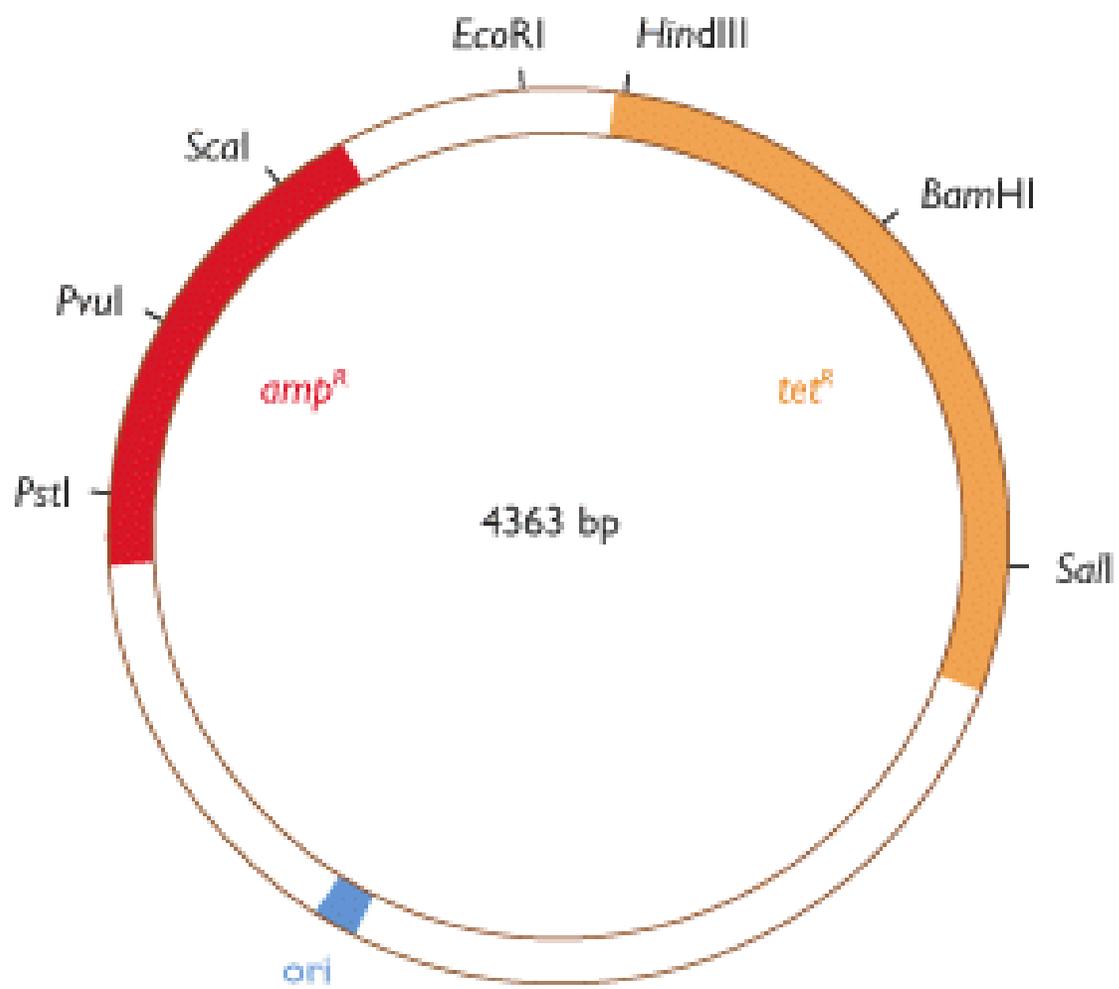
Tipos de vetores para clonagem podem ser usados, dependendo do **tamanho do inserto**:

- **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



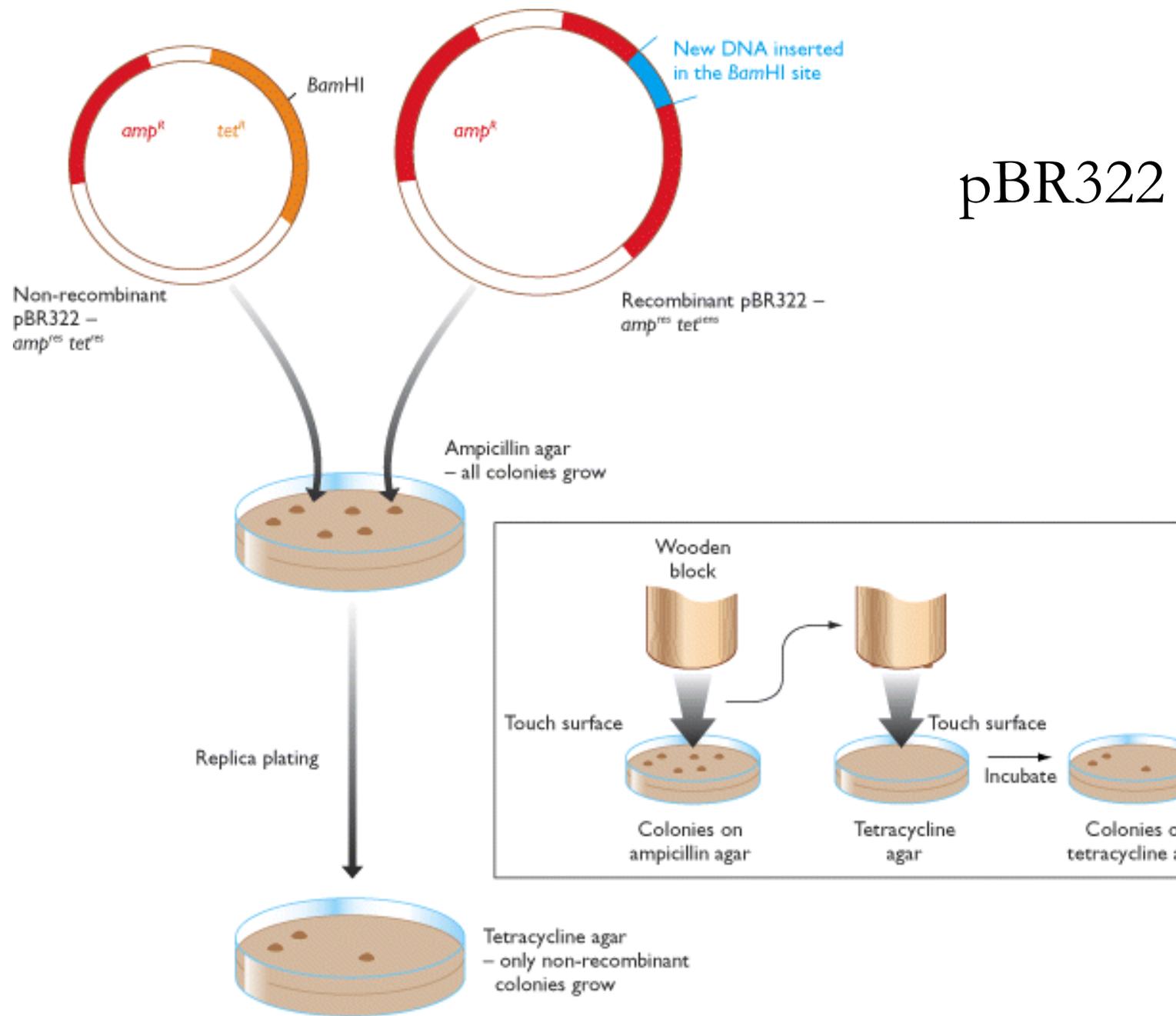
- ✓ ocorrem naturalmente em algumas bactérias
- ✓ são moléculas de DNA dupla fita e circular
- ✓ muitas vezes carregam genes para resistência a antibióticos
- ✓ replicação independente da replicação cromossômica (apresentam uma origem de replicação independente)



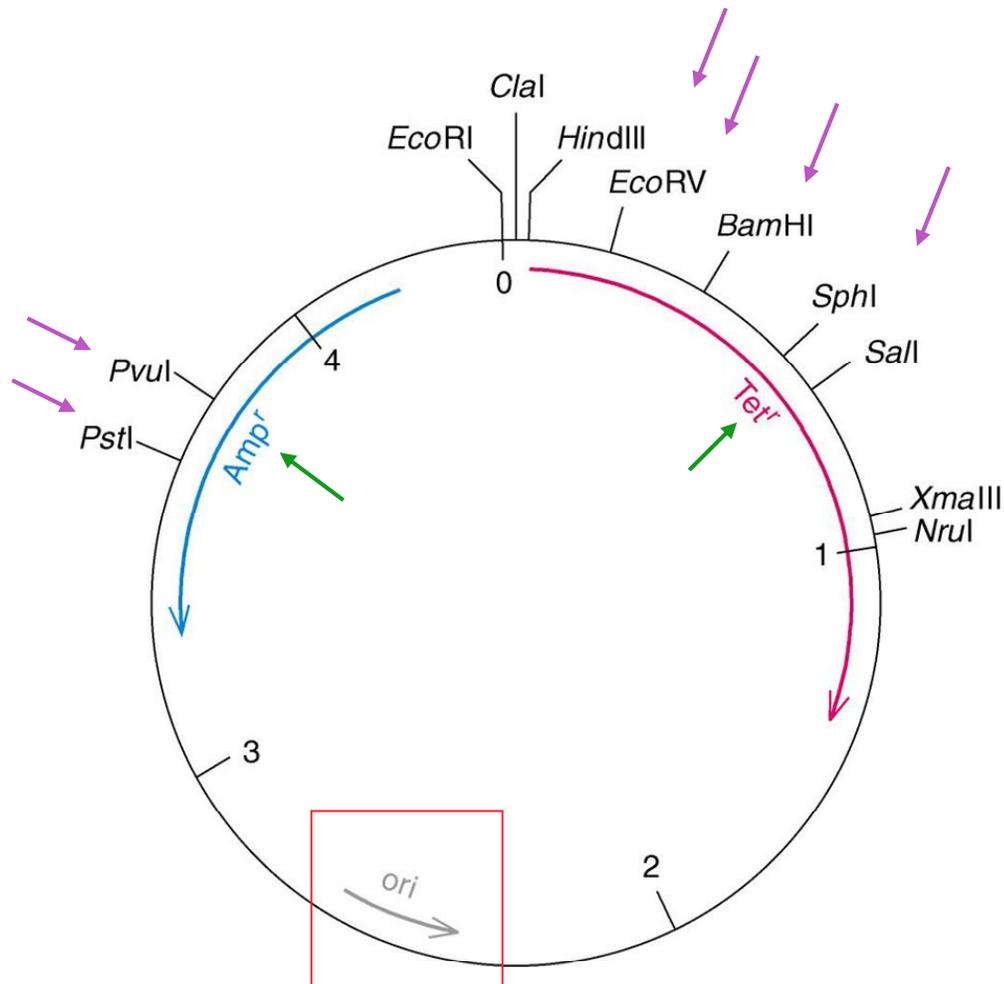
# pBR322

1° plasmídeo -1977

Bolivar et al. 1977



# Vetores: principais características

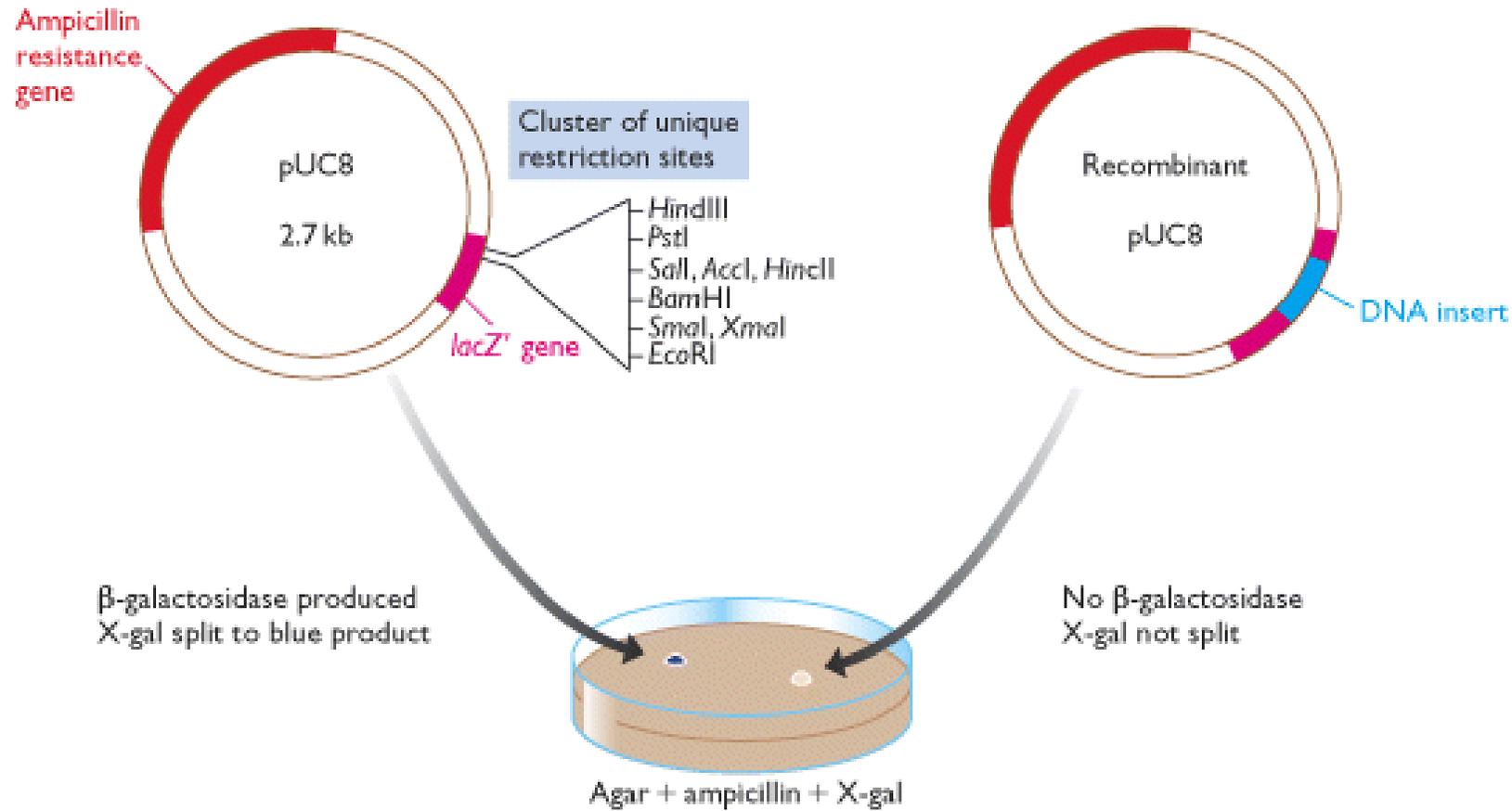


- **Origem de replicação**  
↓  
Permite a autoreplicação, independente do cromossomo
- **Genes de seleção (resistência a antibióticos)**  
↓  
Permite que a célula hospedeira cresça em meio seletivo
- **Múltiplos sítios de clonagem**  
↓  
Permite a inserção de DNA exógeno com flexibilidade de escolha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

# pUC8

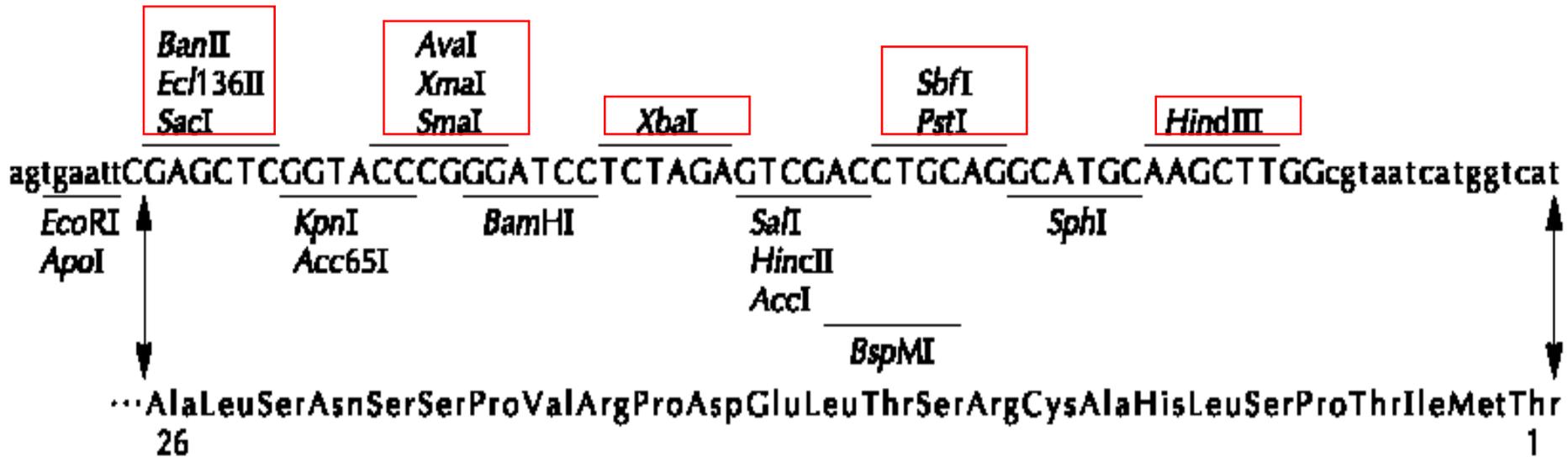
1982

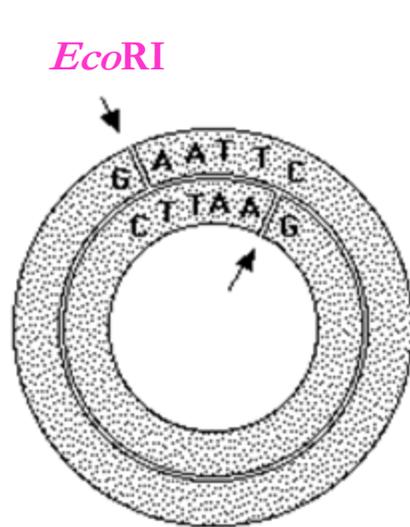
Vieira & Messing



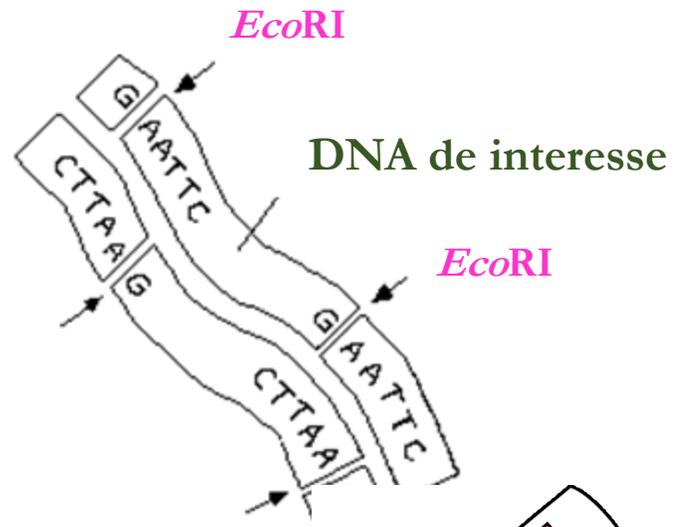
# Vetores de Clonagem

*Poli-linker* (sítio múltiplo de clonagem - MCS)



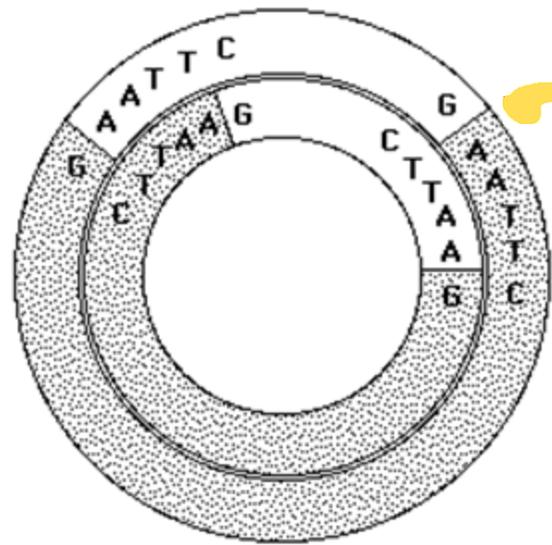


**Plasmídeo**



Extremidades coesivas

Ligação

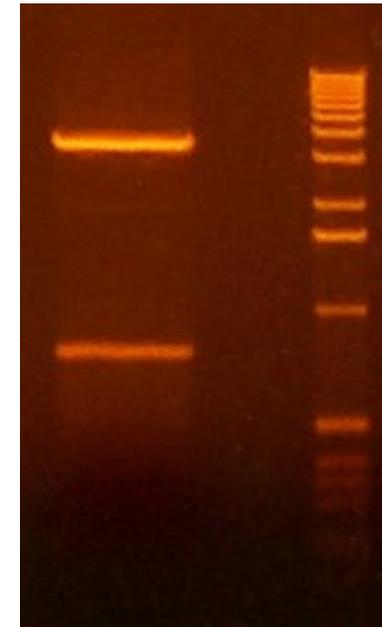
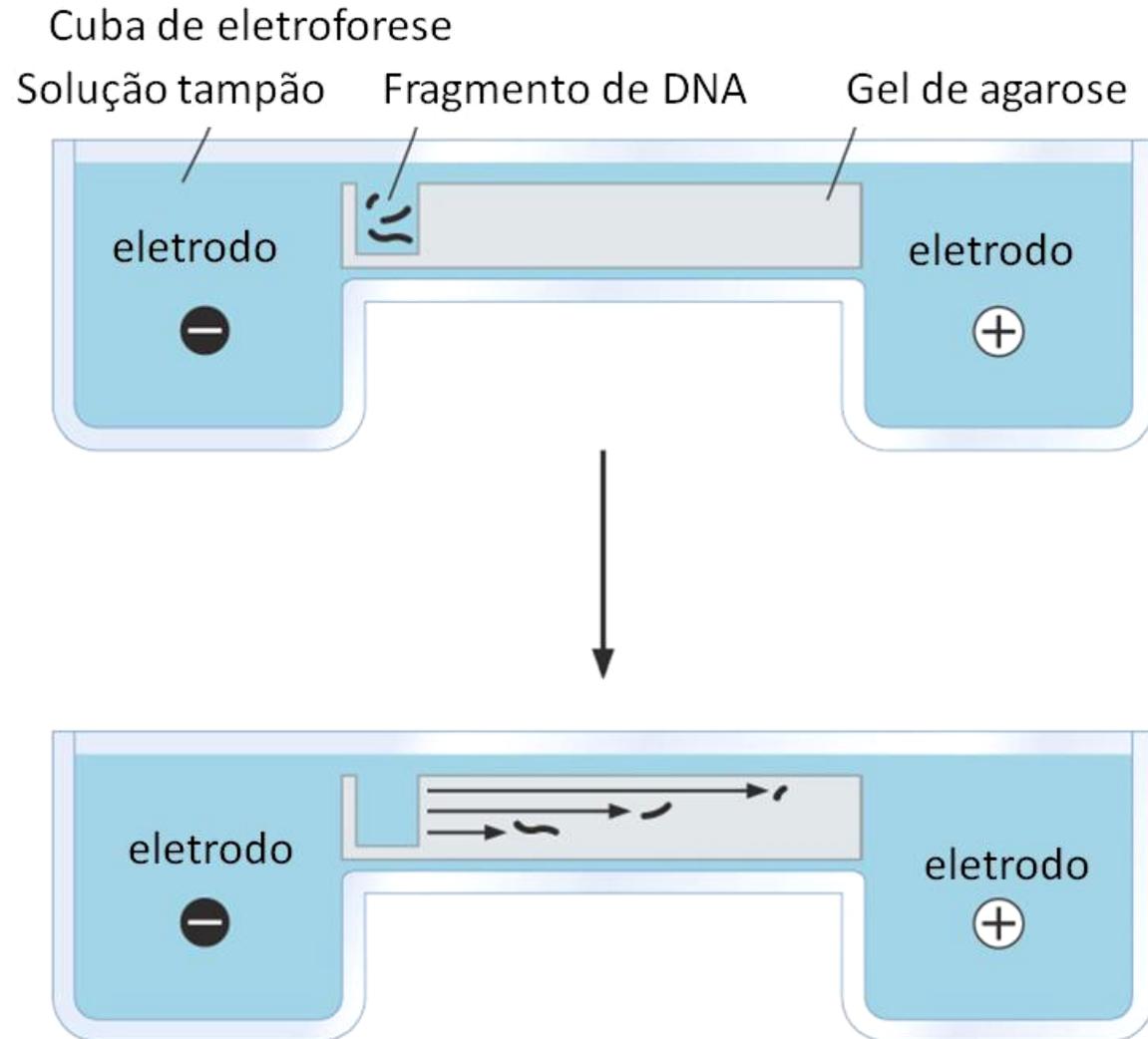


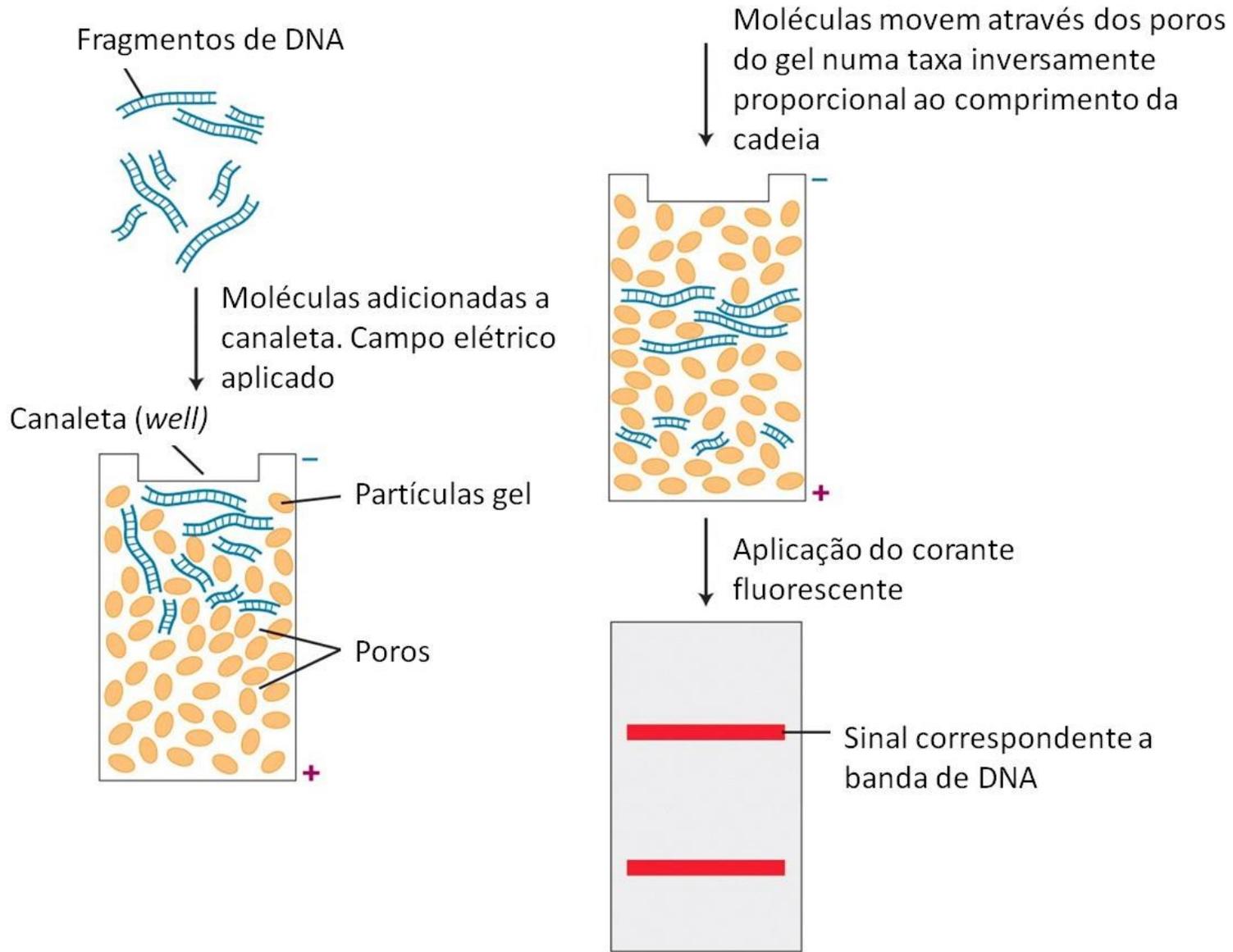
**DNA recombinante**



**DNA ligase**

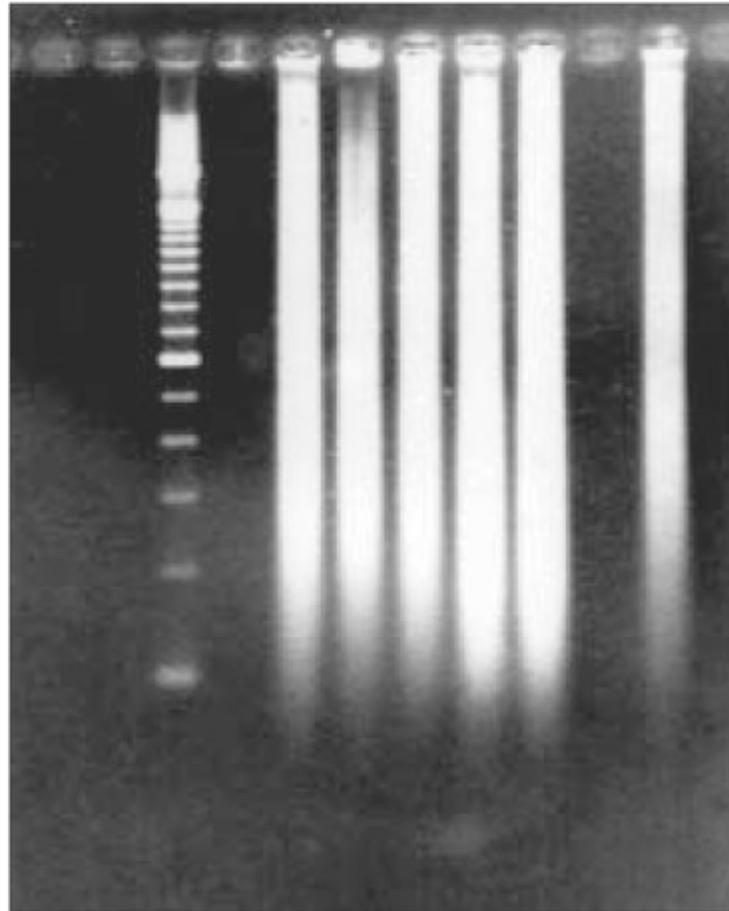
# Eletroforese





# 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.

