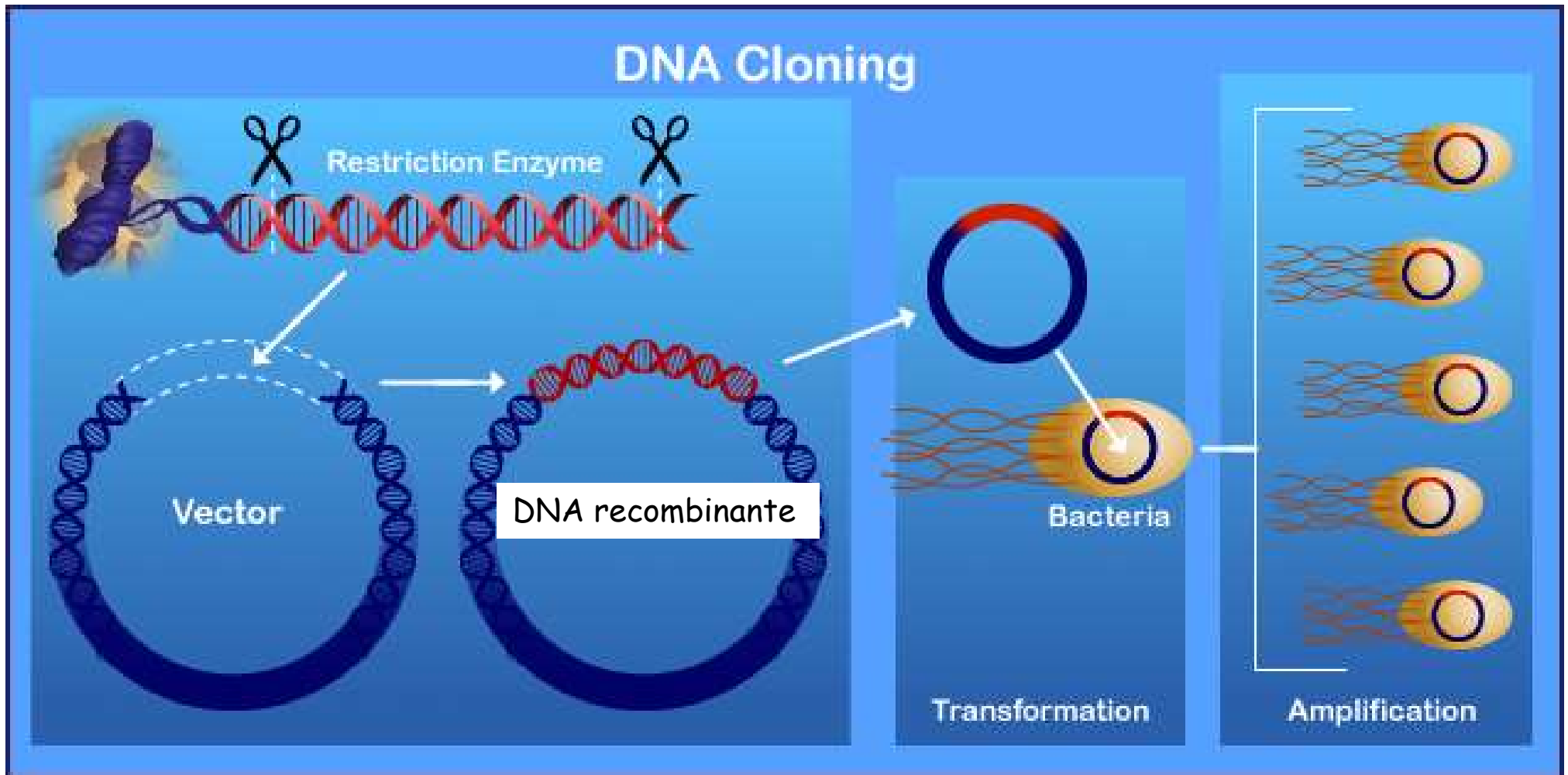


Clonagem Molecular



Bianca Zingales
zingales@iq.usp.br

Clonagem Molecular

Clonagem Gênica

Tecnologia do DNA recombinante

"Engenharia Genética"

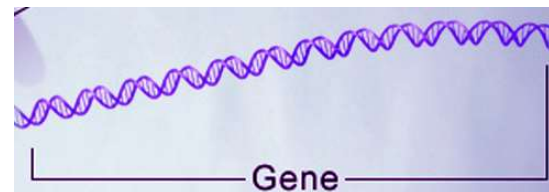
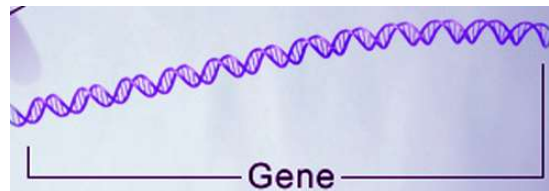
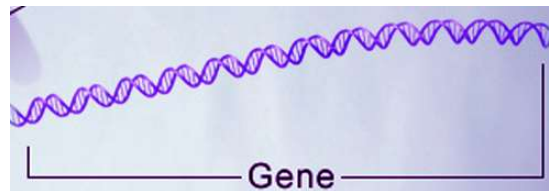
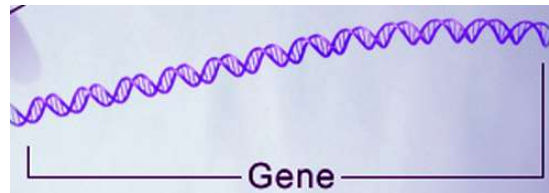
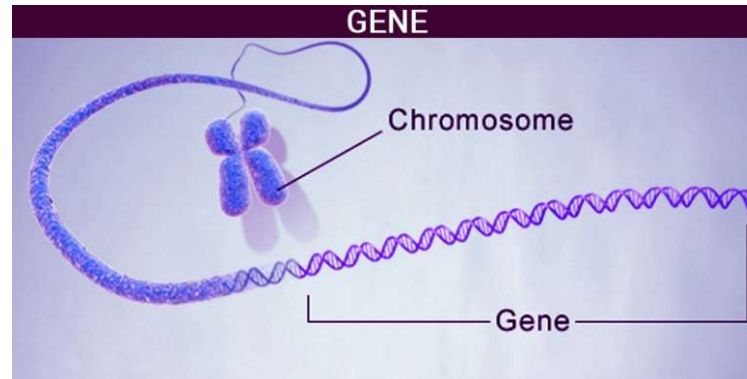
O que é um clone?

Clones humanos

Conjunto de indivíduos que possuem as mesmas características genéticas



Clones de um gene



Cópias idênticas do mesmo gene

Clonagem Gênica

Definição:

Processo que tem por objetivo a geração de cópias idênticas de um gene ou de partes de um gene

Finalidade:

Pesquisa

Biotecnologia

Informações

PCR é usada para amplificar genes de interesse.

PCR não é usada para obter genes em larga escala para fins Biotecnológicos.

Neste caso, usa-se a Clonagem Gênica

Vantagens - Maior rendimento
- Menor custo

Referências

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/22214/1/DOC191.pdf>

https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1391255/mod_resource/content/1/Clonagem_molecular.pdf

<https://biologysara.weebly.com/fundamentos-de-engenharia-geneacutetica/fundamentos-de-engenharia-genetica>

Premissa para a Clonagem Gênica

O Código Genético é Universal



G C
G C
C G
A T
C G
A T
A G
G C
G C
C G
C G
C G
G C



T A
A G
T C
A G
A G
C A
G A
G C
G C



G C
G C
G C
C G
C G
C G
T A
A G
G C
A C
C G
C G

A sequência de um gene de QUALQUER organismo é "lida" corretamente por bactérias, leveduras, ovelhas, homem, plantas, etc.

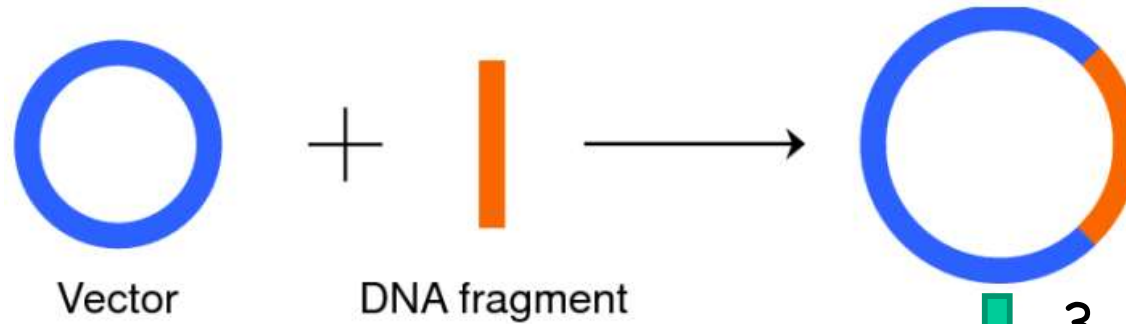
"lida" = replicada, transcrita, traduzida

Resumo do processo para clonagem de um gene

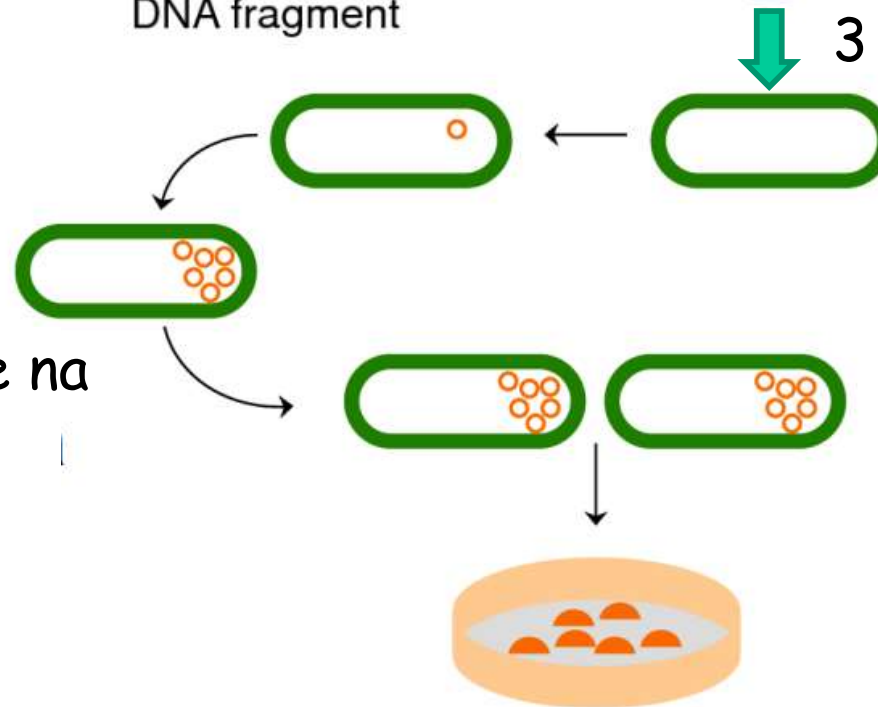
1. Isolar o gene

2. Ligação do gene a um vetor (elemento de DNA)

Vetor recombinante



3. Introdução do Vetor recombinante na célula hospedeira

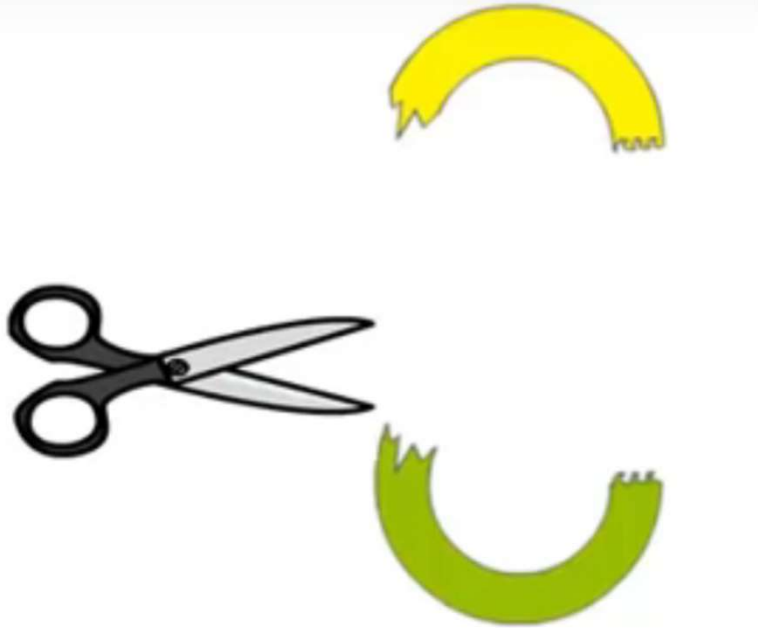


4. Amplificação do Vetor recombinante na célula hospedeira

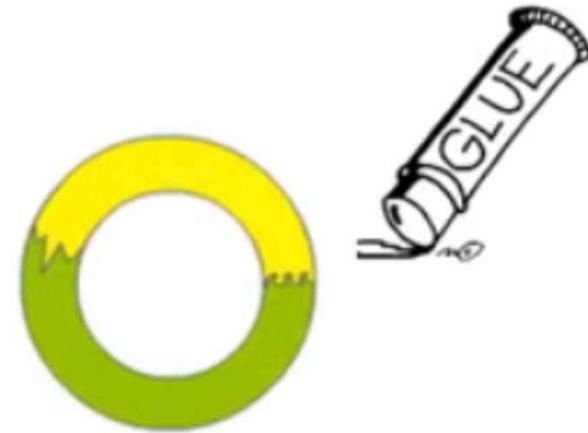
Ferramentas para a Clonagem Gênica

- Enzimas de Restrição
- DNA ligase
- Vetores de clonagem

Enzimas usadas na clonagem gênica



Enzimas de Restrição
Cortam DNAs



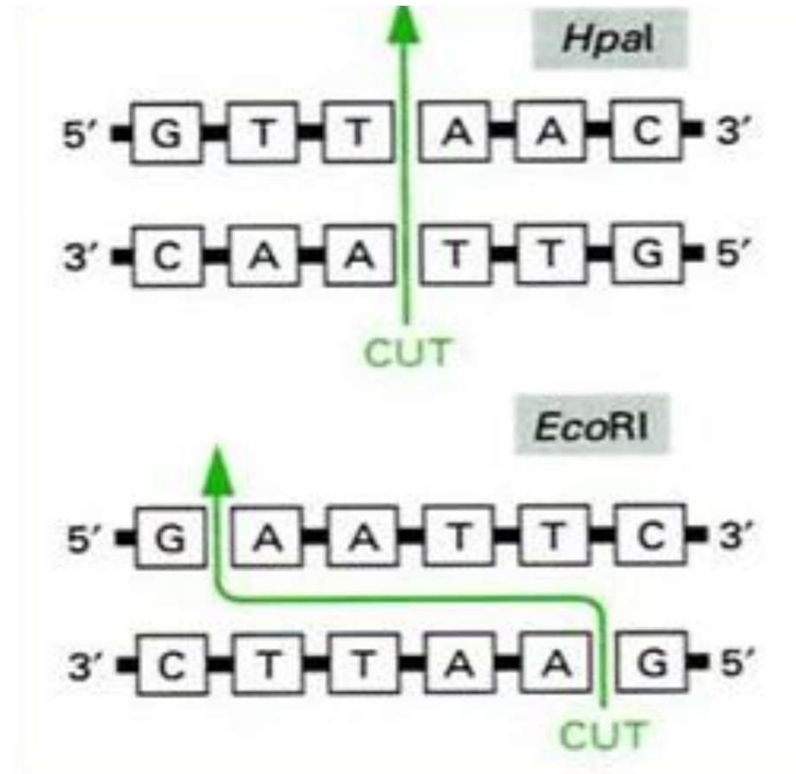
DNA ligases
Ligam DNAs

Enzimas de Restrição

Produzidas por bactérias e arqueas*

Características

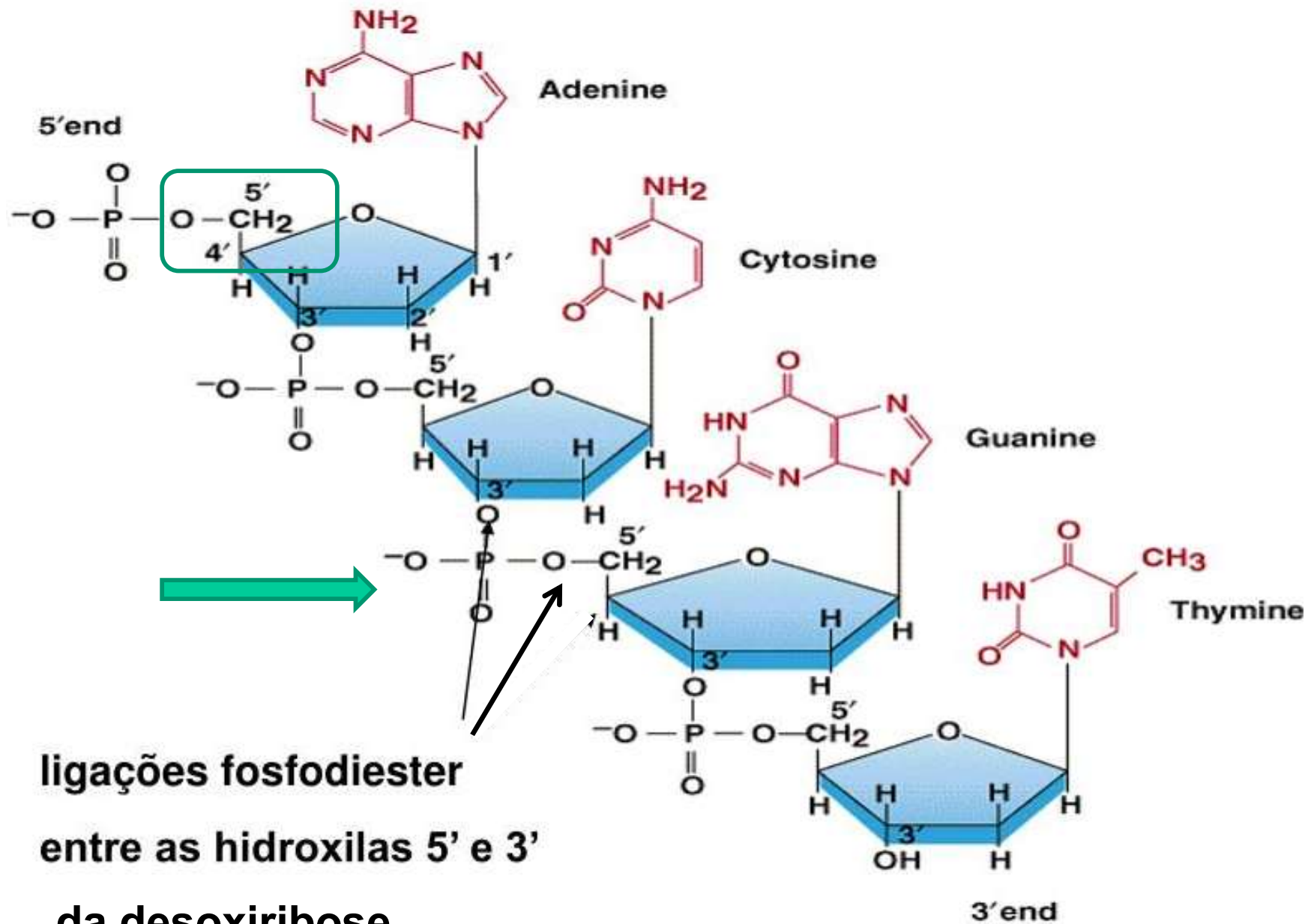
- Endonucleases
- Cortam DNA de dupla fita
- Cortam o DNA em ambas as fitas
- Clivam a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos
- Reconhecem sequências Palindrômicas



Há **centenas** de Enzimas de restrição diferentes

*Arqueas - organismos procariontes

Clivam a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos



Reconhecem sequências Palindrômicas

Palíndromos

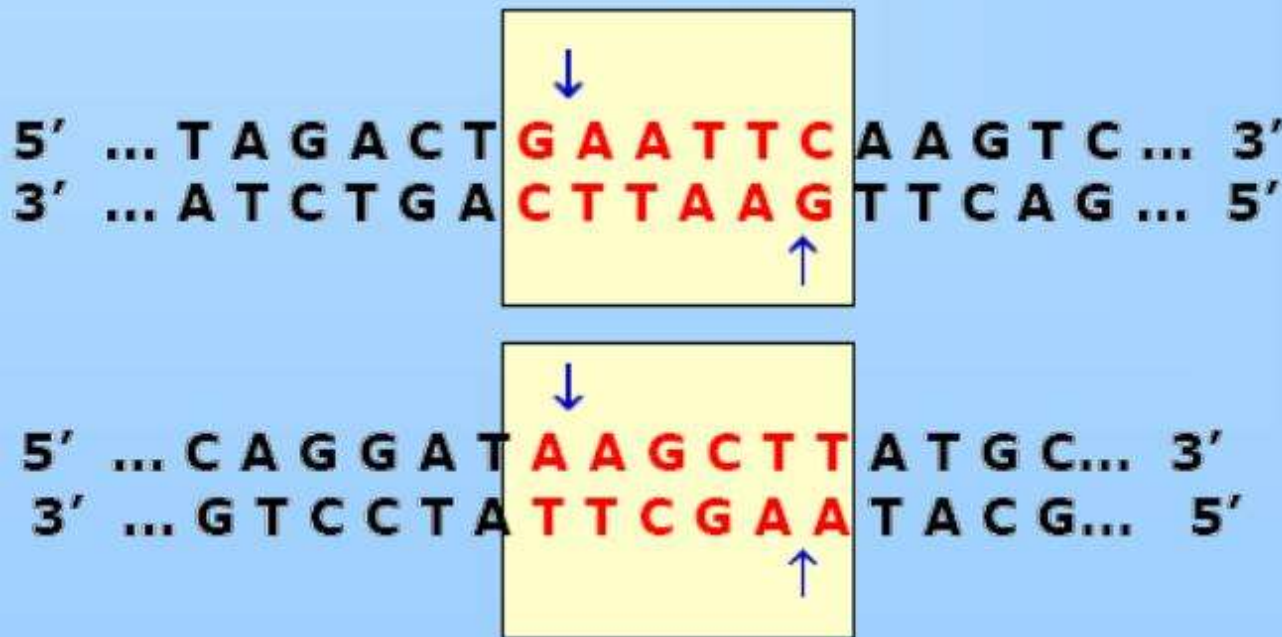
OVO

a bola da loba

socorram-me subi no ônibus em Marrocos

anotaram a data da maratona

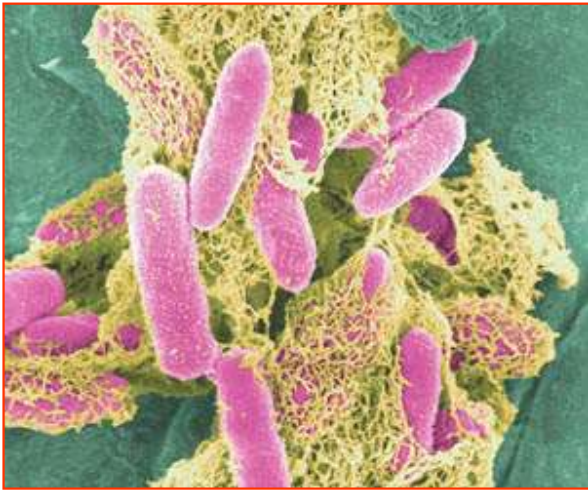
erro comum ocorre



Sequências
palíndromas nas
fitas
complementares
do DNA

Nomenclatura das Enzimas de Restrição

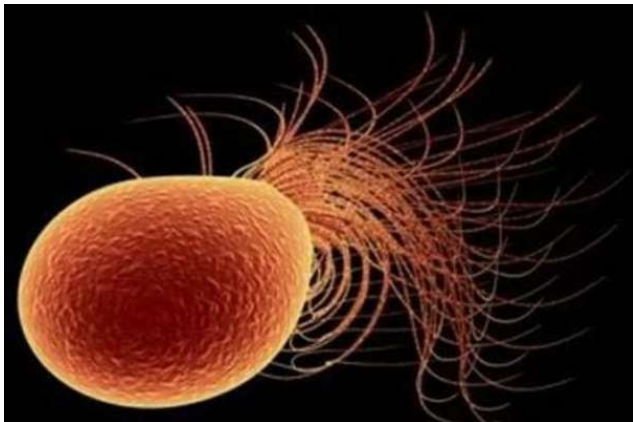
Tomam seu nome a partir do gênero e espécie do organismo do qual foram isoladas (bactérias e arqueas)



EcoRI - *Escherichia coli* (linhagem RI)

HaeIII - *Haemophilus aegyptius*

BamHI - *Bacillus amyloliquefaciens*



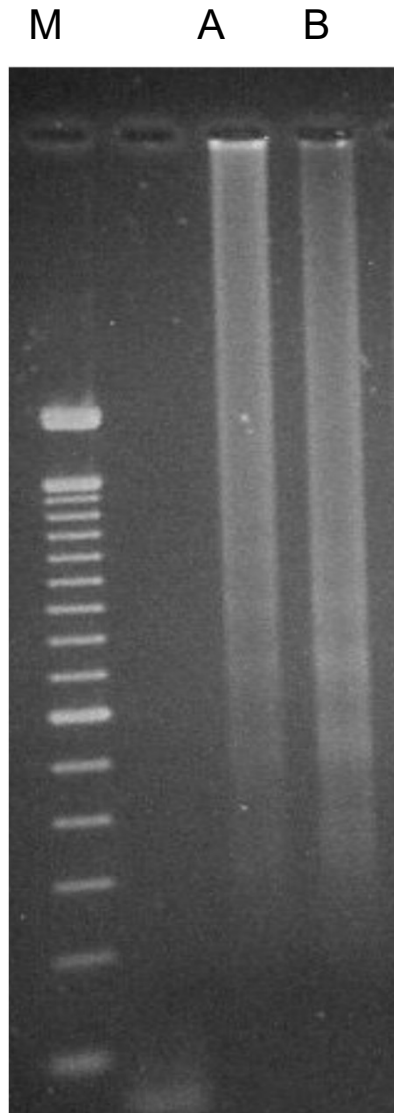
PspGI - *Pyrococcus sp.*

Cada Enzima de Restrição reconhece uma sequência palindrômica específica

Enzimas	Origem	Sequência de restrição
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G-
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	-C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C-
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	-G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G-
SalI	<i>Streptomyces albus</i>	-G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G-
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	-G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G-
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	-T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T-

As sequências de cada Enzima de restrição estão presentes inúmeras vezes no DNA de todos os organismos

Exemplo

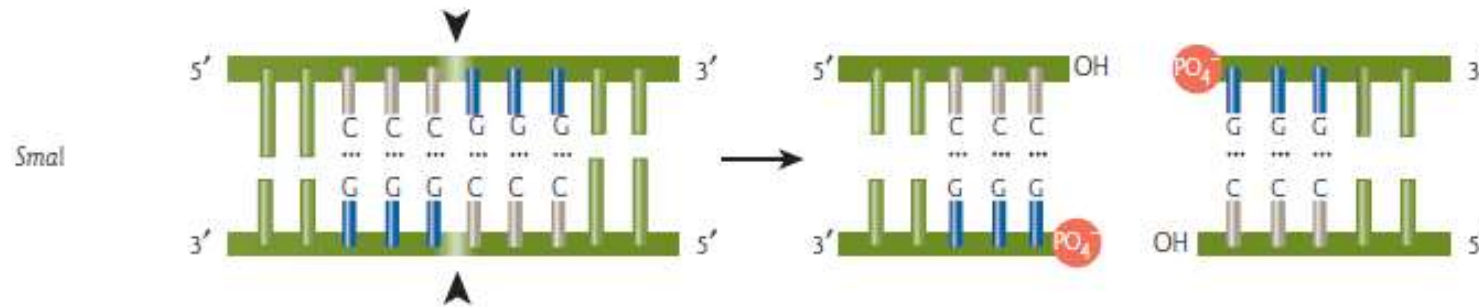


DNA dos organismos A e B foi digerido com a enzima EcoRI e analisado em gel de agarose.

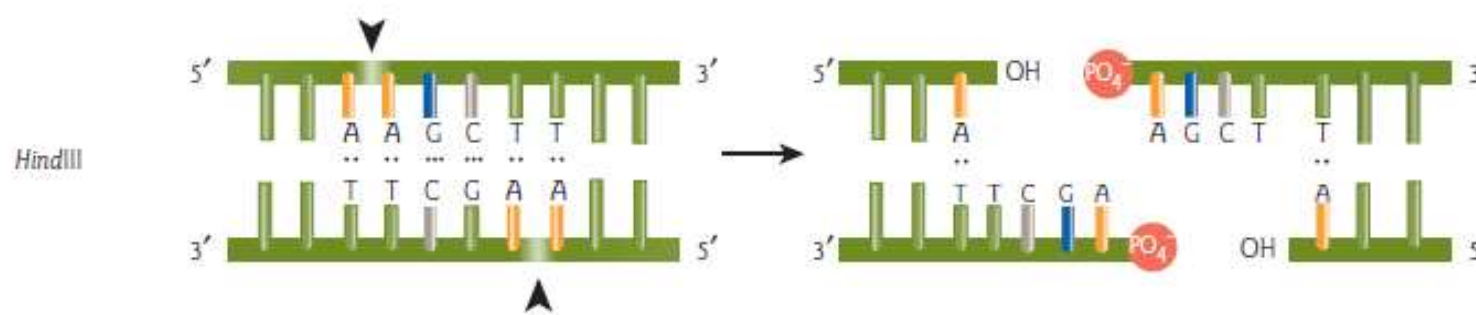
Milhares de fragmentos de DNA de tamanho diferente.

Tipos de corte das Enzimas de Restrição

Geração de "extremidades cegas" (Blunt ends)



Geração de "extremidades coesivas" (Sticky ends)



Notar as extremidades 5'-P e 3'-OH das fitas de DNA

Grande parte das ER origina extremidades coesivas

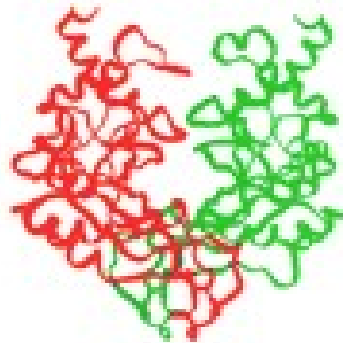
Enzimas	Origem	Sequência de restrição	Extremidade
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-	Sticky
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	-G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G-	Sticky
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	-A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A-	Sticky
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G-	Sticky
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	-C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C-	Sticky
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	-G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G-	Sticky
SalI	<i>Streptomyces albus</i>	-G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G-	Sticky
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	-C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C-	Blunt
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	-G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G-	Sticky
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	-T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T-	Sticky



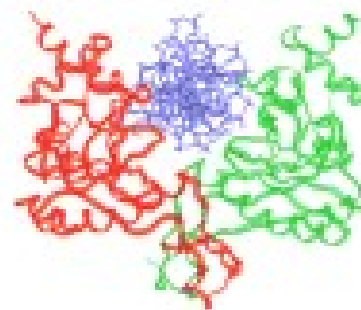
Estrutura das enzimas de restrição - Diméricas

<http://www.iq.usp.br/bayardo/software/proteina/advanced/cap3/tarefas3.html>

EcoRV

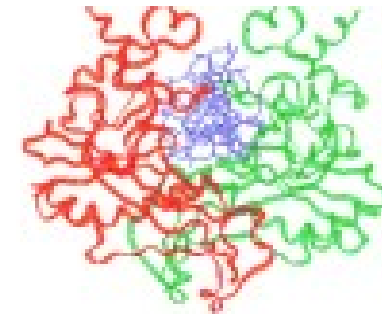


Sequência de DNA
não específica



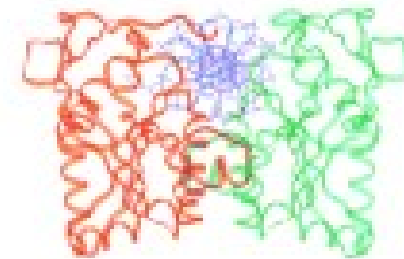
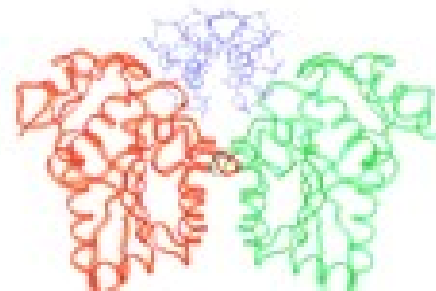
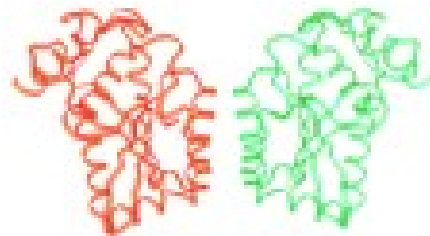
Não "encaixa"

Sequência de
DNA específica



"encaixa"

BamHI



Íon necessário: Mg^{2+} ou Ca^{2+} ou Mn^{2+}

Por que as enzimas de restrição não hidrolisam o DNA da bactéria que as produz?

R: As enzimas de restrição representam um sistema de defesa da bactéria

Como?

CADA bactéria produtora da Enzima de restrição produz também uma DNA metilase que metila todos os sítios de restrição reconhecidos por esta Enzima no DNA da Bactéria

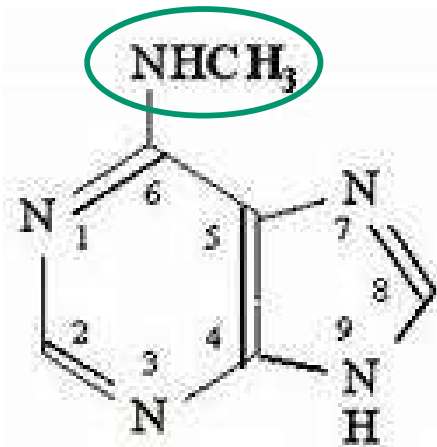
E. coli RI - EcoRI e EcoRI metilase

E. coli RV - EcoRV e EcoRV metilase

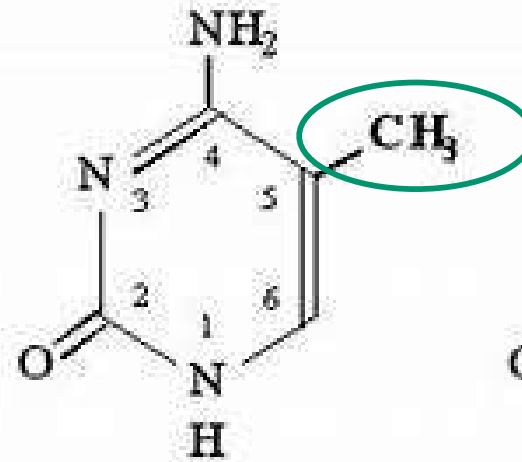
B. amyloliquefaciens HI - BamHI e BamHI metilase

A sequência de DNA metilada NÃO é hidrolisada pela enzima de restrição.

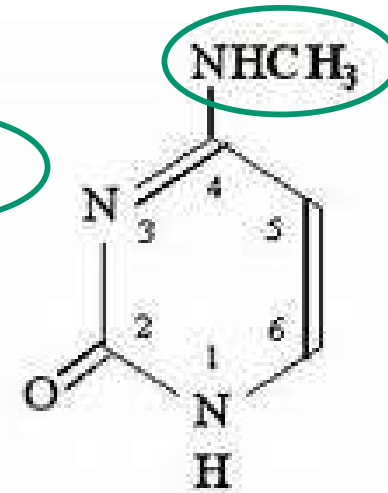
Bases nitrogenadas metiladas



N₆ methyl adenine



C₅ methyl cytosine

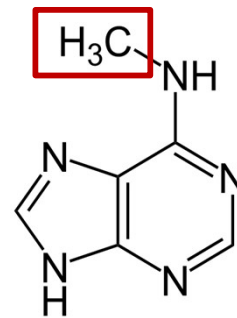


N₄ methyl cytosine

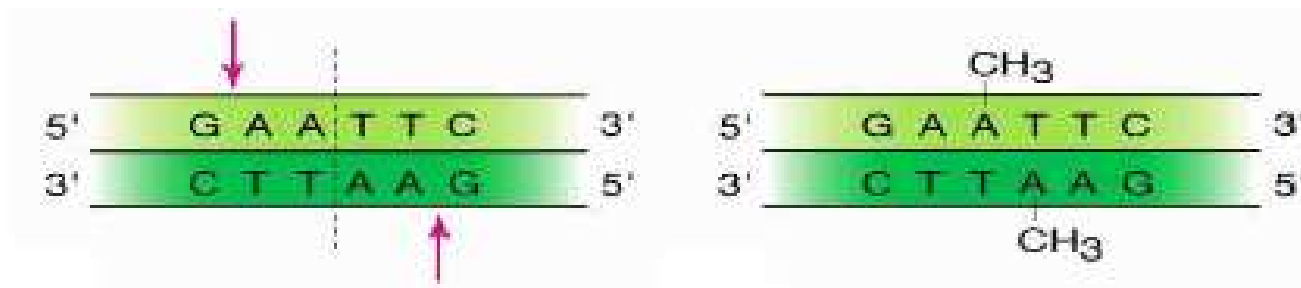
Exemplo

Escherichia coli produz EcoRI e EcoRI metilase

EcoRI metilase



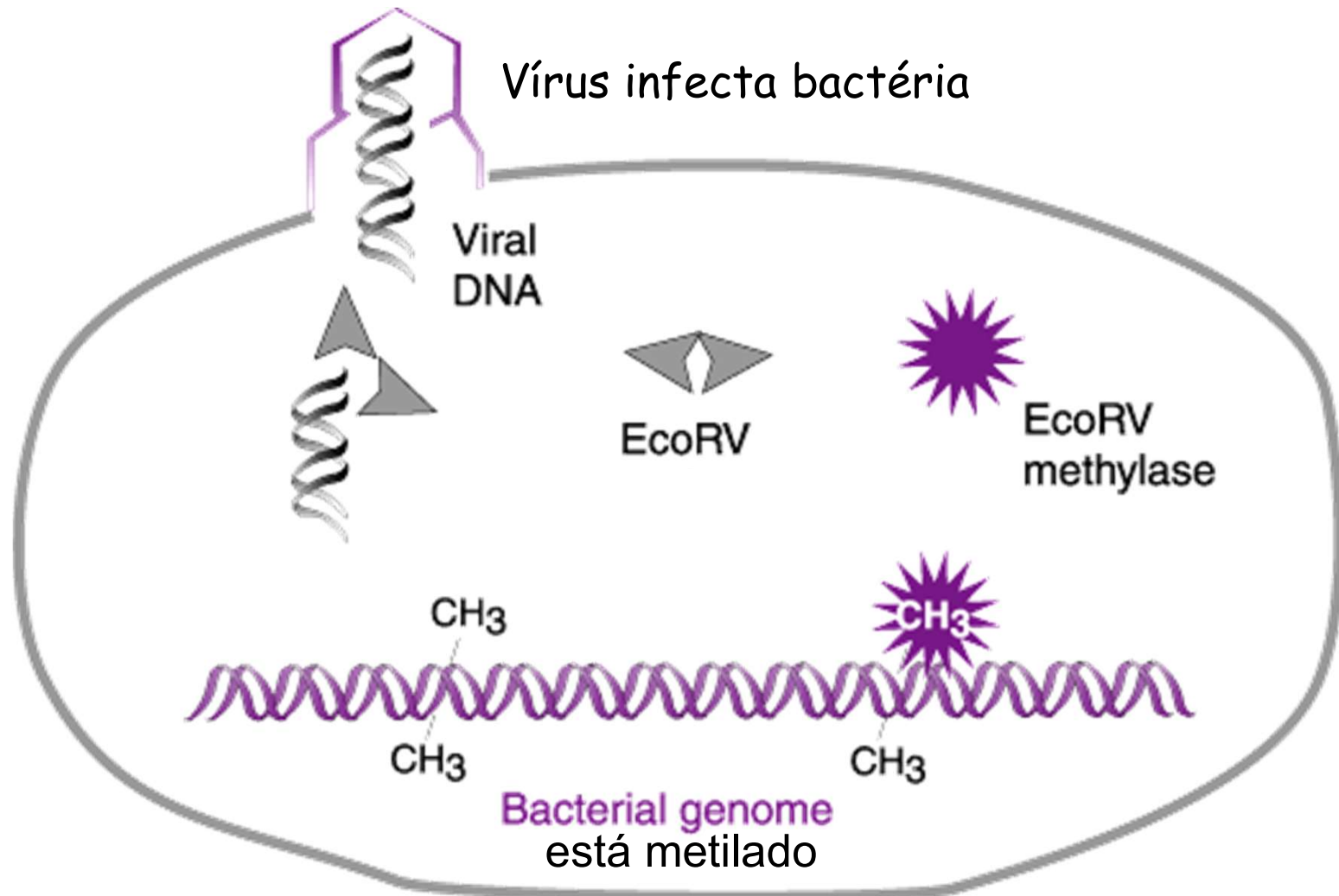
6-Metiladenina



EcoRI não corta no sítio de restrição metilado

Função das enzimas de restrição na bactéria

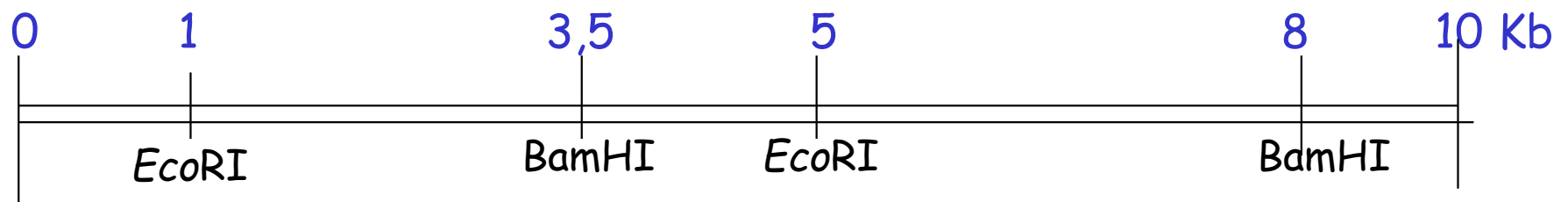
Sistema de defesa



EcoRV hidrolisa o DNA do vírus que não está metilado

Mapa de Restrição (exercício)

Definição: Esquema de uma molécula de DNA **dupla fita** com a indicação dos locais de corte reconhecidos por **Enzimas de Restrição**



Sítios para as enzimas de restrição

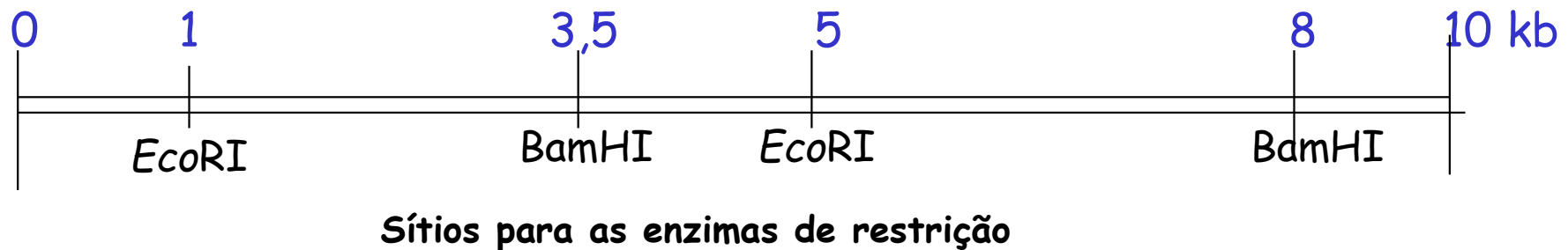
Nota: Kb está para Kpb; também kb e kpb

Exercício

Um DNA linear (de dupla fita) de 10 kb foi incubado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*.

Determinar o tamanho dos fragmentos gerados por digestão com:

(a) *EcoRI*; (b) *BamHI* e (c) mistura de *EcoRI* + *BamHI*.



EcoRI: 1kb; 4kb, 5kb.

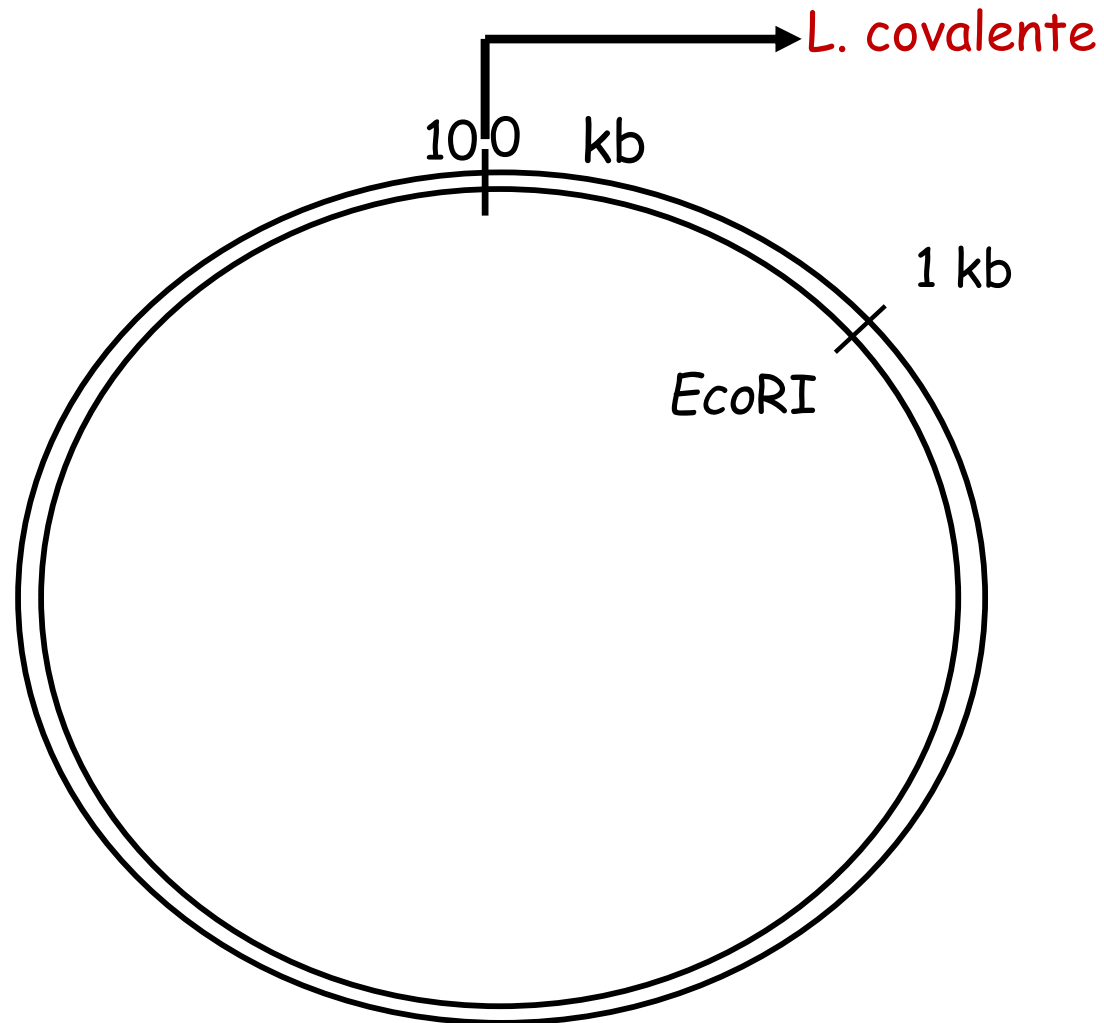
BamHI: 3,5kb; 4,5kb, 2kb.

EcoRI + *BamHI*: 1kb; 2,5kb; 1,5kb; 3kb; 2kb.

Exercício

Transformar o DNA linear de 10 kb (dupla fita) em DNA circular

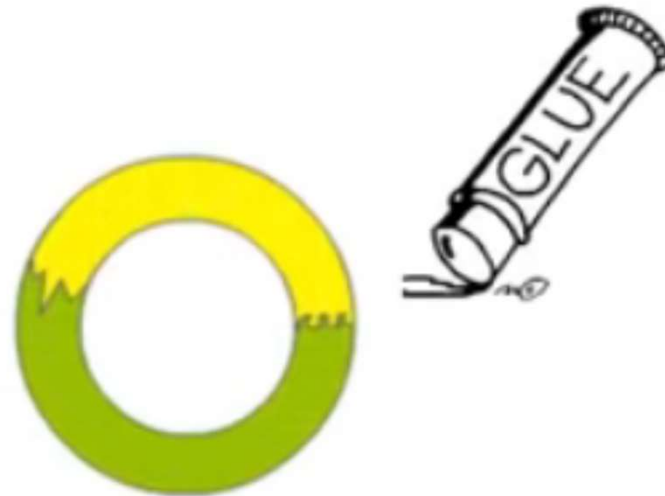
Determinar o tamanho dos fragmentos gerados por digestão com: (a) *EcoRI*; (b) *BamHI* e (c) mistura de *EcoRI* + *BamHI*.



DNA ligase

Liga fragmentos de DNA dupla fita

do mesmo organismo ou de organismos diferentes

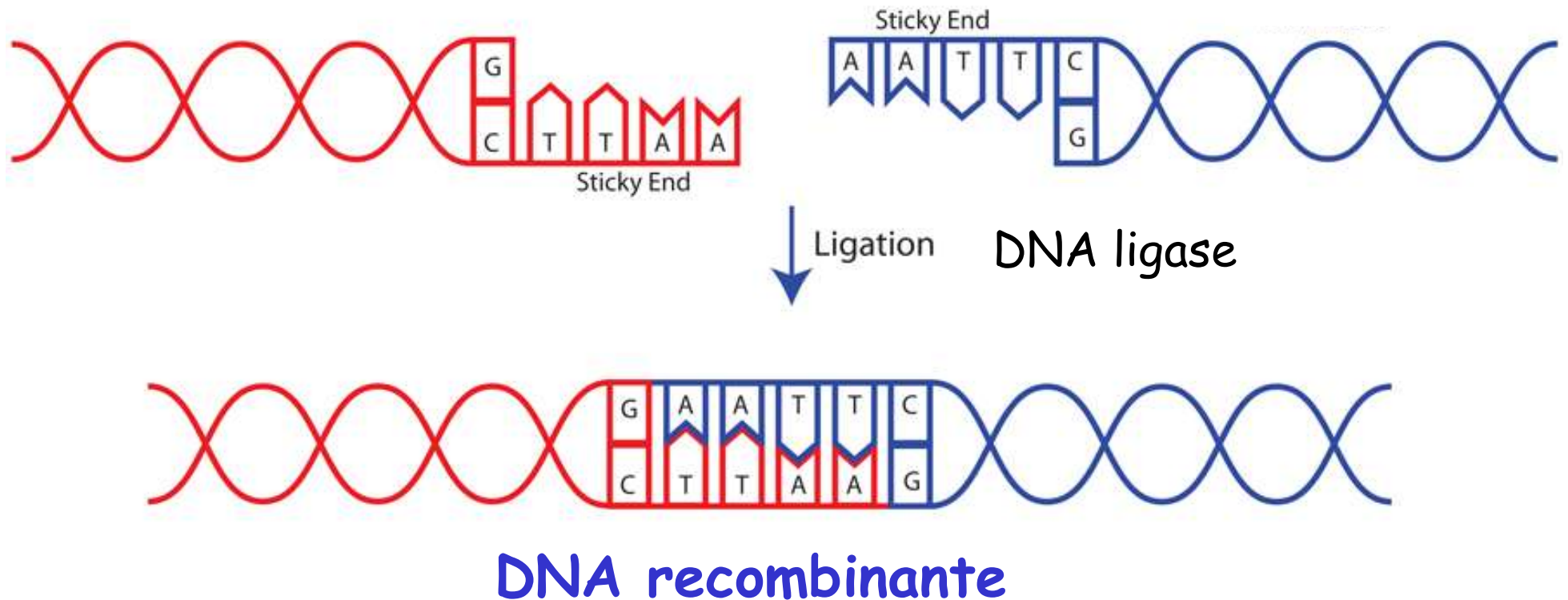


Nota: Se ligar DNAs de organismos diferentes gera-se um DNA recombinante

DNA ligase

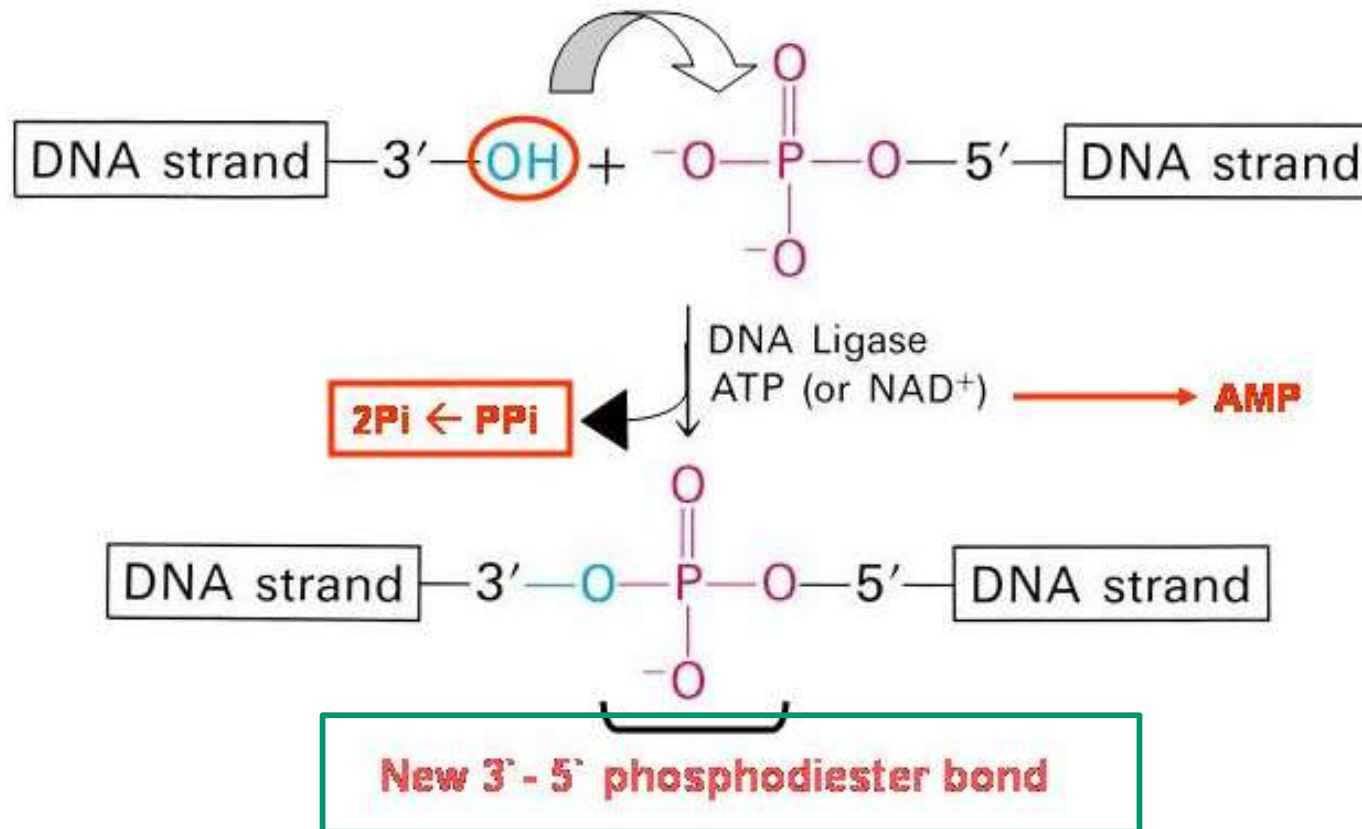
Moléculas de DNA dupla fita de organismos diferentes

Ambos os DNAs foram digeridos com a mesma enzima de restrição. Geram-se extremidades coesivas



Notar que a sequência reconhecida pela Enzima de restrição foi reconstituída

DNA ligase



Ligação de cada fita dos DNAs

Ligação de extremidades coesivas ou de extremidades cegas

Ferramentas para Clonagem Gênica

- ✓ Enzimas de Restrição
- ✓ DNA ligase
- Vetores de clonagem - "carregam" DNA

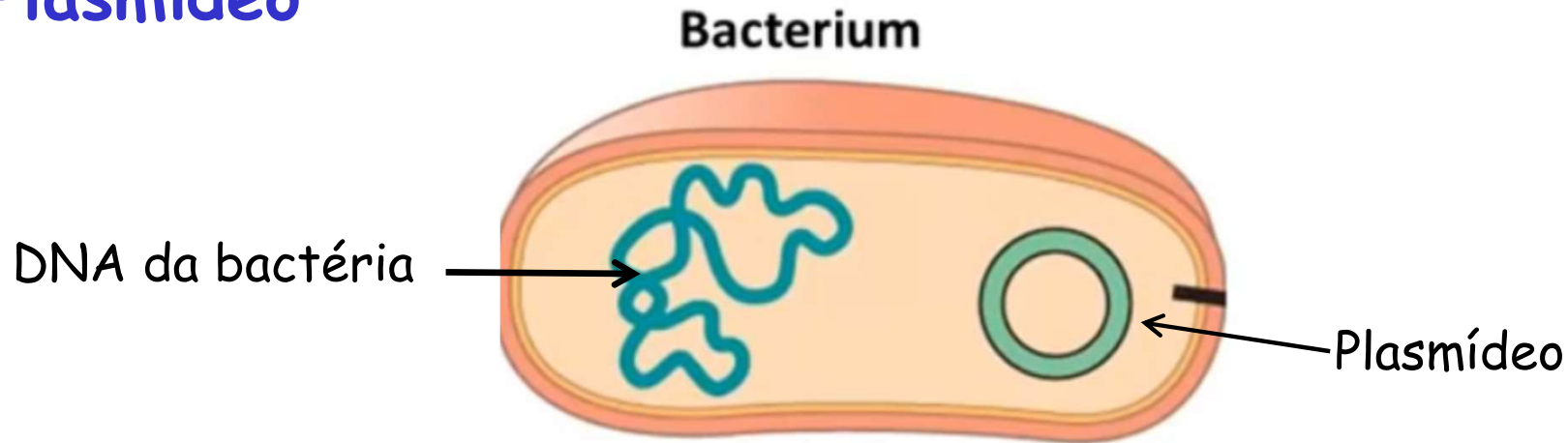
Vetores de clonagem

Três elementos básicos devem estar presentes em qualquer vetor de clonagem

- Uma Origem de Replicação (ORI)
- Um Marcador de Seleção (geralmente confere resistência a antibiótico)
- Sítios para Enzimas de Restrição

Vetores de clonagem

Plasmídeo



- Plasmídeo: Elemento de **DNA dupla fita** (~1 a 100 kb)
- Replica-se na célula hospedeira
- Usa toda a maquinaria da célula hospedeira para sua replicação (DNA polimerase, etc.)
- Há plasmídeos específicos para bactérias e para células eucarióticas (fungos, células animais e vegetais)

Nota: Plasmídeo não tem capsídeo como ocorre nos vírus

Plasmídeo

DNA dupla fita circular

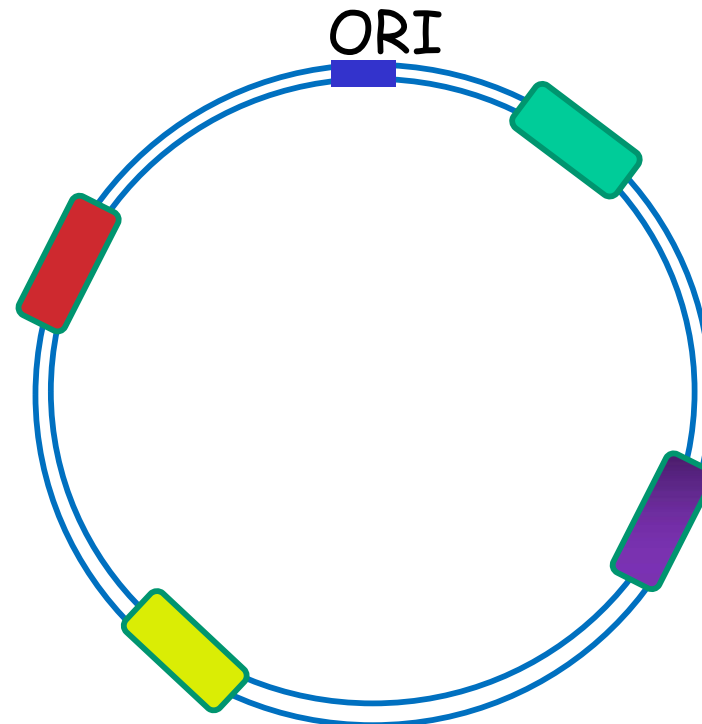
Contém sequências e genes específicos

Elemento 1: ORI = Origem de replicação.

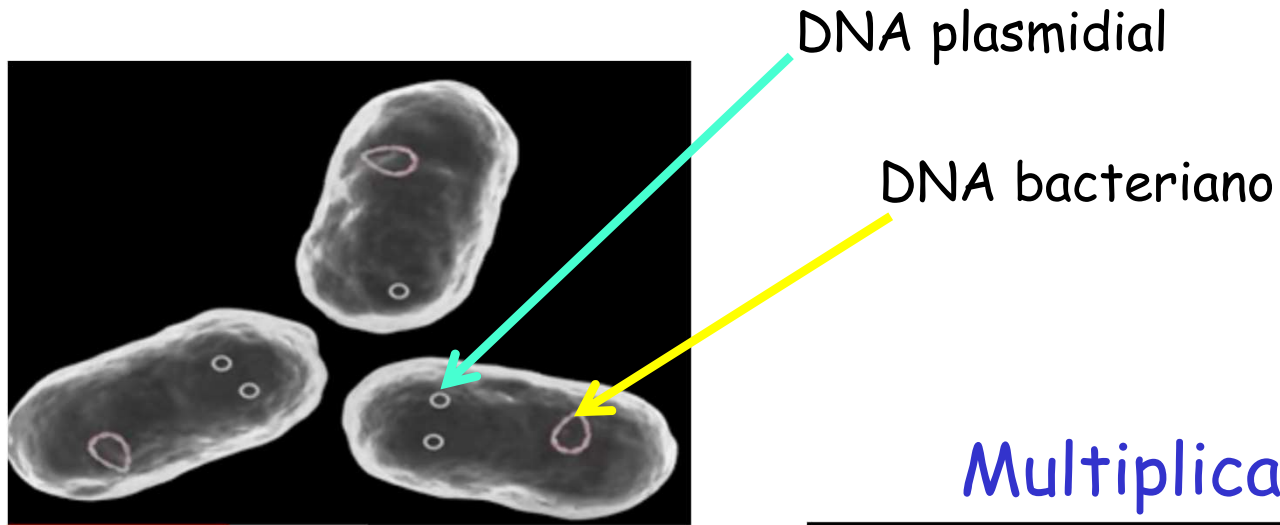
Sequência reconhecida pela **DNA polimerase do hospedeiro**.

Local onde se inicia a replicação do DNA do plasmídeo.

Essencial para a duplicação do plasmídeo



Plasmídeos bacterianos



Multiplicação



Plasmídeo replica-se na bactéria sem necessidade de o DNA bacteriano replicar-se

Usa a maquinaria de replicação bacteriana

<https://www.youtube.com/watch?v=GNMJBM+KKWU>

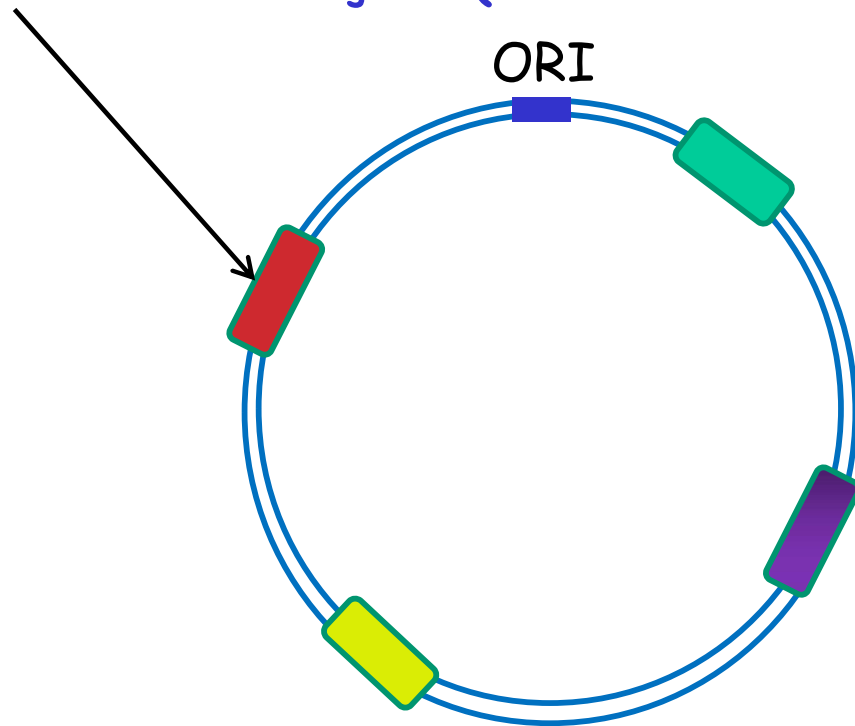
Plasmídeos como Vetores para Clonagem

Plasmídeos **naturais** foram "engenheirados" por biólogos moleculares para tornar-se **vetores de clonagem**

- Vetores podem ser estocados sem perder suas características.
- Vetores de clonagem são **vendidos** por Companhias especializadas.

Elemento 2

Gene marcador de seleção (confere resistência a antibiótico)



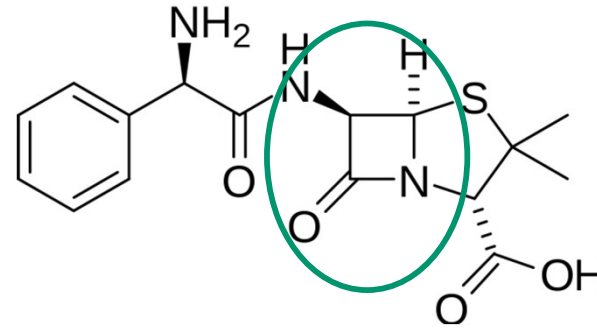
Função: verificar se o vetor (plasmídeo) foi introduzido na célula hospedeira

Em geral usa-se um gene cujo produto confere resistência a um antibiótico

O mais comum é o gene cujo produto confere resistência a Ampicilina - anotado como Amp^R

2. Gene marcador Amp^R

Antibiótico Ampicilina



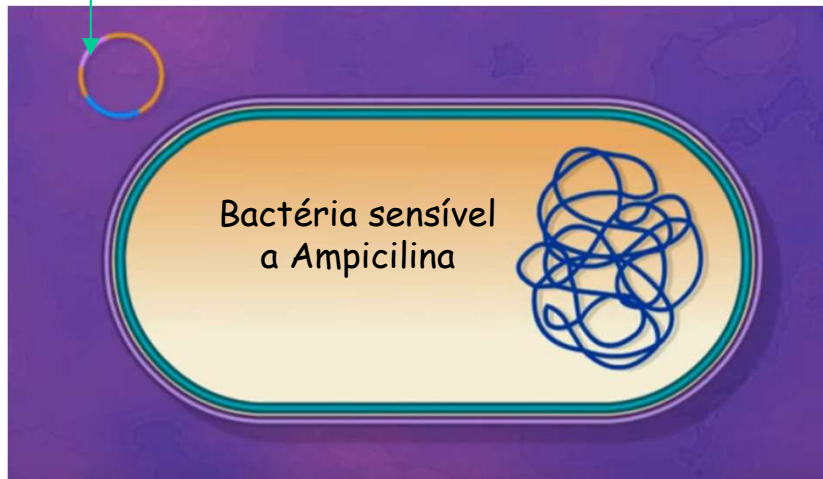
O gene **Amp^R** codifica a enzima beta-lactamase que rompe o anel β lactâmico da Ampicilina, inativando-a

Quando o plasmídeo é introduzido na bactéria, a bactéria que "morria" em presença de Ampicilina passa a ser resistente ao antibiótico

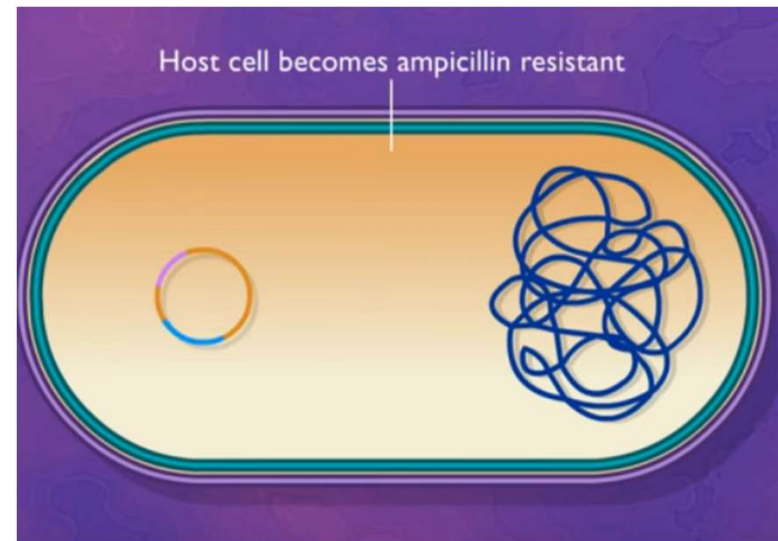
Elemento 2. Gene marcador de seleção

Função: Identificar as bactérias portadoras do plasmídeo

Plasmídeo recombinante que contém o gene para Resistência a Ampicilina



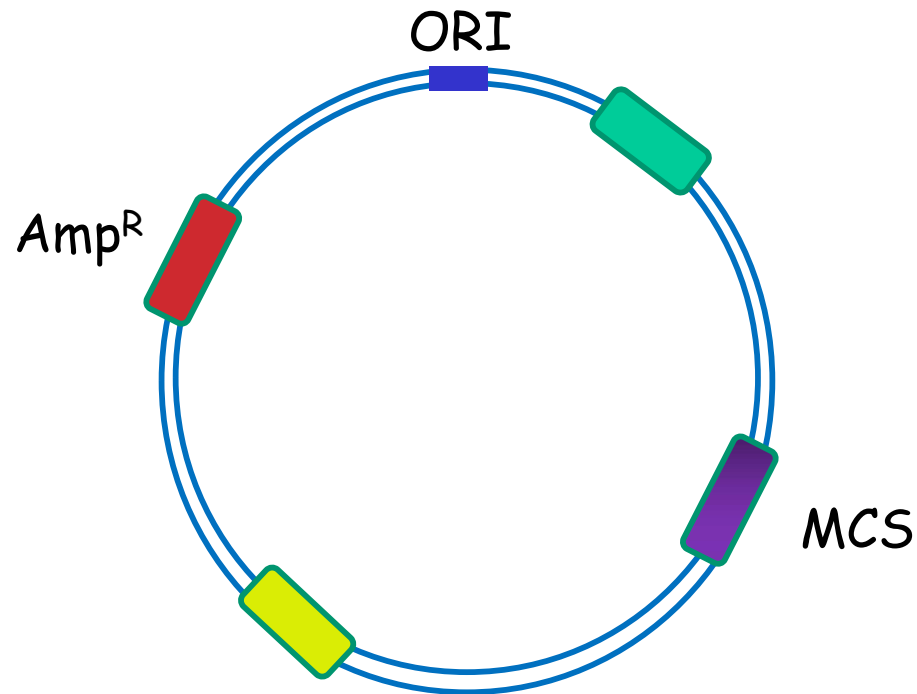
Quando o plasmídeo entra na bactéria Bactéria torna-se resistente à Ampicilina



Na Aula Prática usaremos um vetor que tem como marcador de seleção a resistência ao antibiótico Canamicina (Kan^R)

Elemento 3. Sítios para Enzimas de Restrição

Região MCS - Multiple Cloning Site



Função: Permite introduzir o DNA exógeno

Elemento 3. Região MCS - Multiple Cloning Site

Segmento de DNA do vetor que contém sequências reconhecidas por diferentes enzimas de restrição (Multiple Cloning Site).

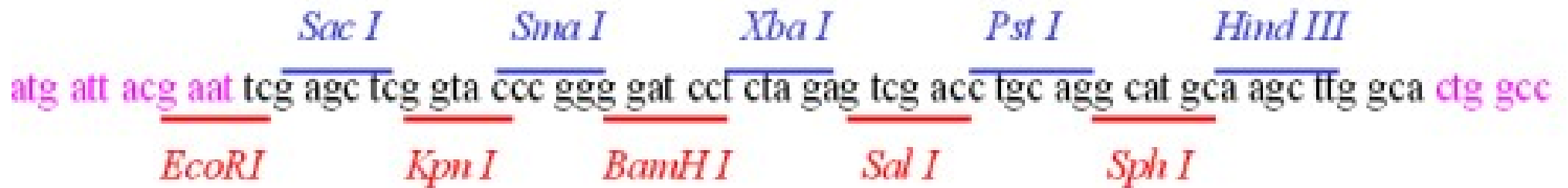
Permite escolher qual enzima de restrição usar para clonar o gene de interesse

Sítios criados por síntese química (uma fita de DNA e a fita complementar)

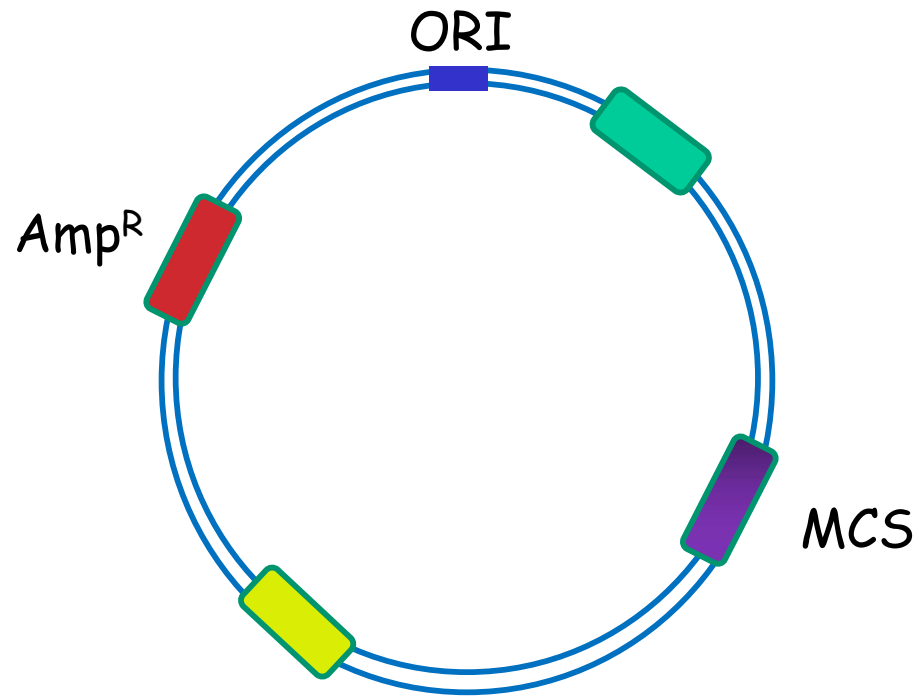
Como no caso dos primers da PCR

Exemplo de uma Região MCS - Multiple Cloning Site

Segmento de DNA dupla fita com sequência definida para 10 enzimas de restrição



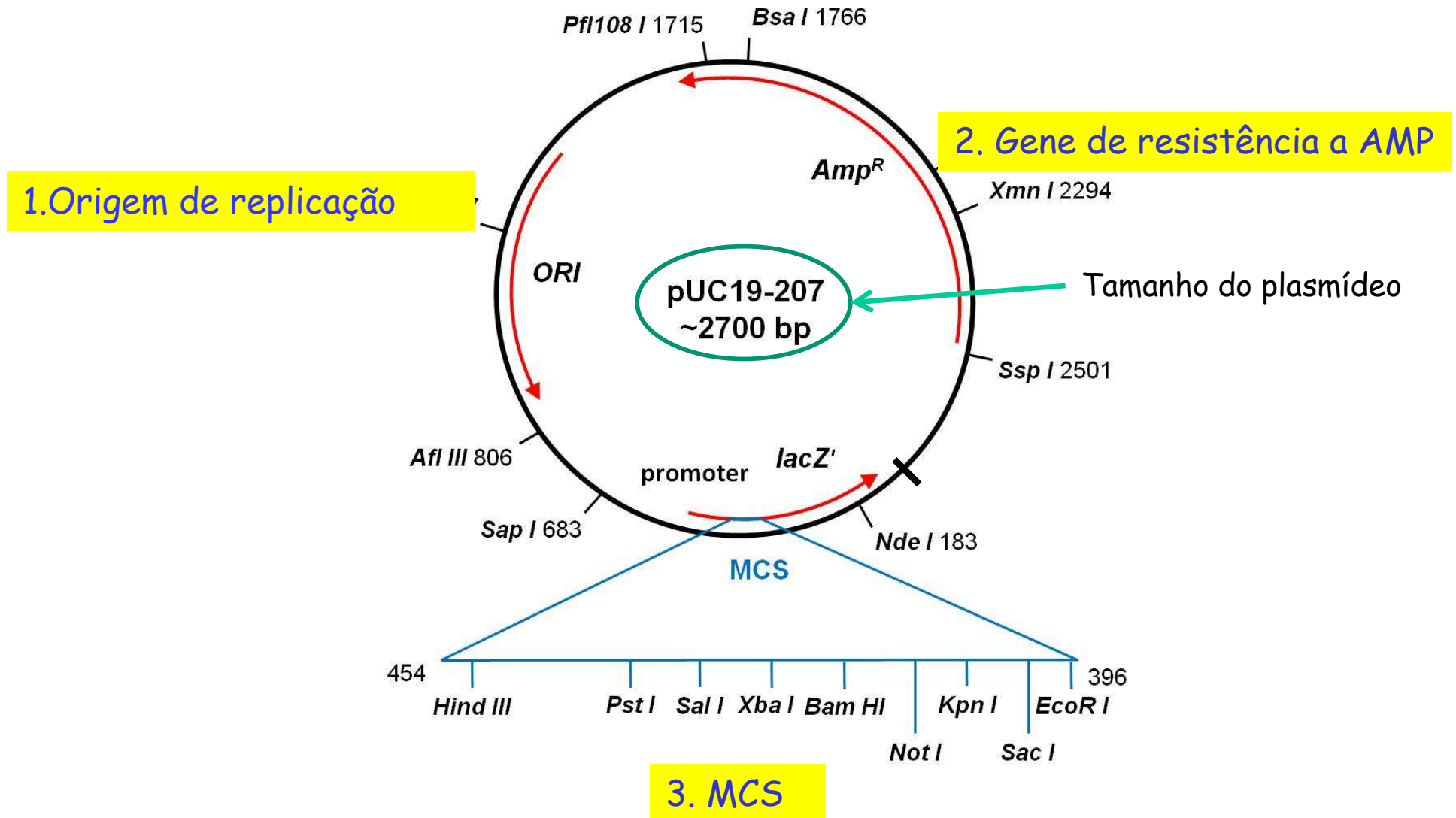
Plasmídeos contém outros genes



Exemplos de Plasmídeos para Clonagem

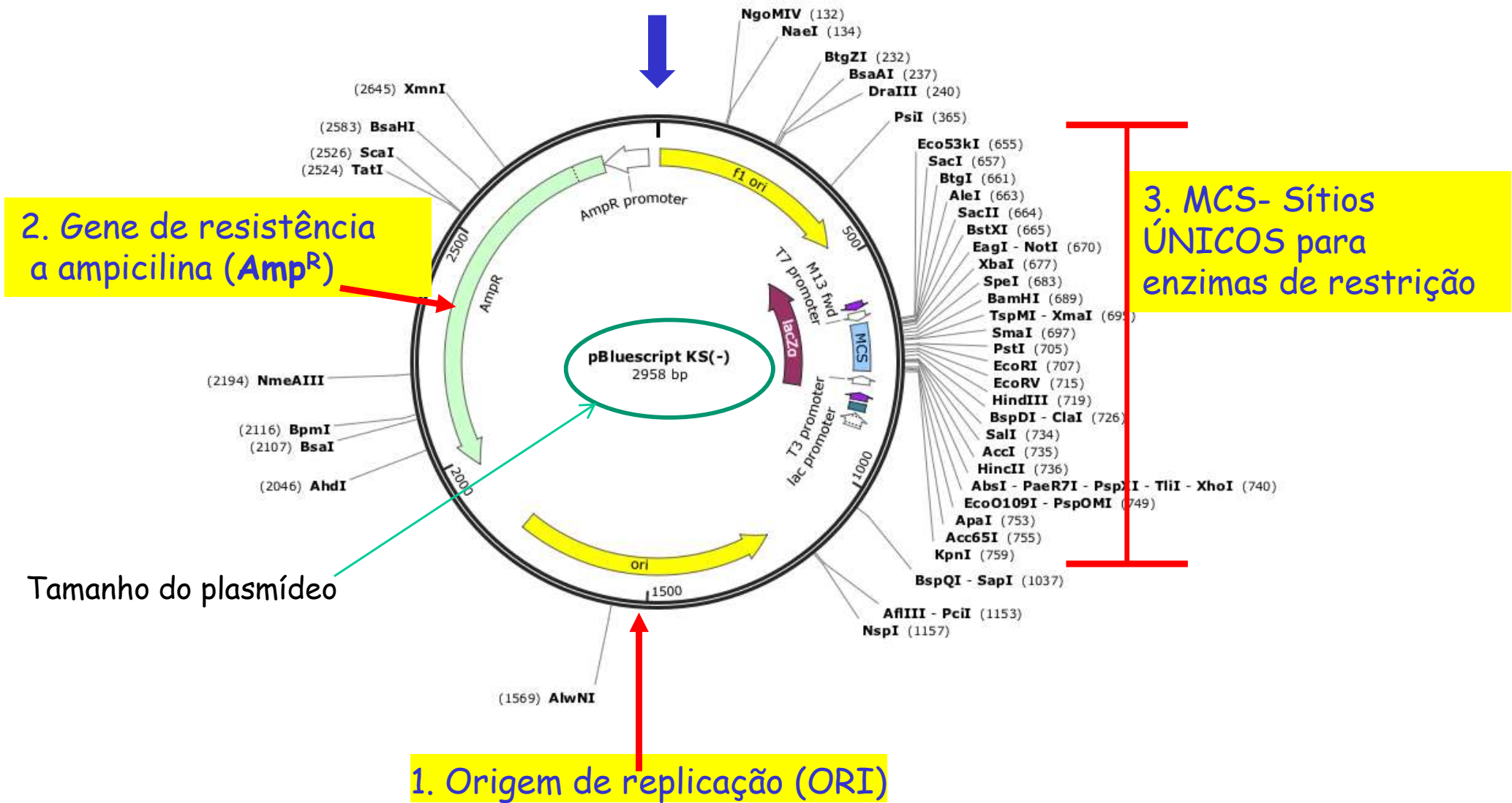
Nota: São comprados

Plasmídeo pUC19-207 (~2700 pb = ~ 2,7 kb)



pBluescript KS (2958 pb)

Mapa de Restrição do Plasmídeo



Procedimentos para Clonagem Gênica

Leitura recomendada

<https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning>

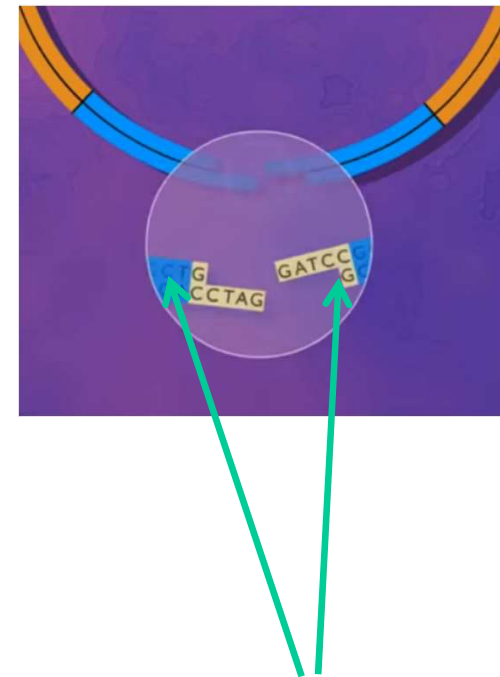
Exemplo de um procedimento

Amplificar o gene de interesse por PCR e purificar o produto da reação

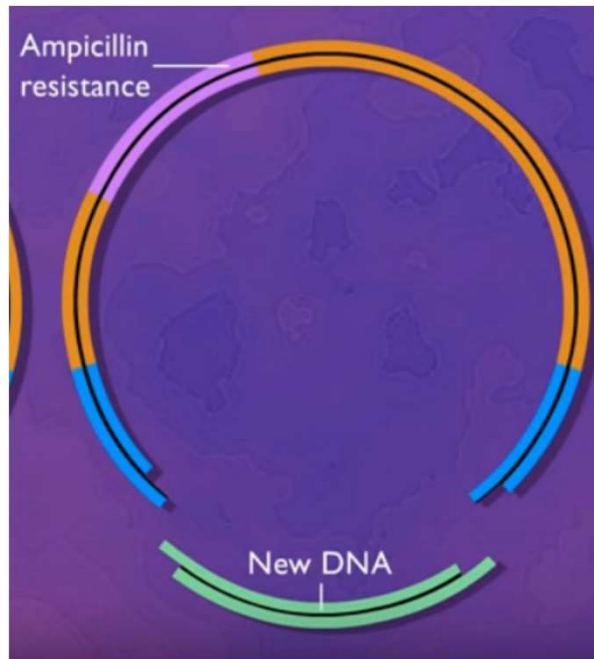


Adicionar nas extremidades sequências coesivas reconhecidas por uma Enzima de restrição

Digerir o DNA do plasmídeo com a mesma enzima de restrição

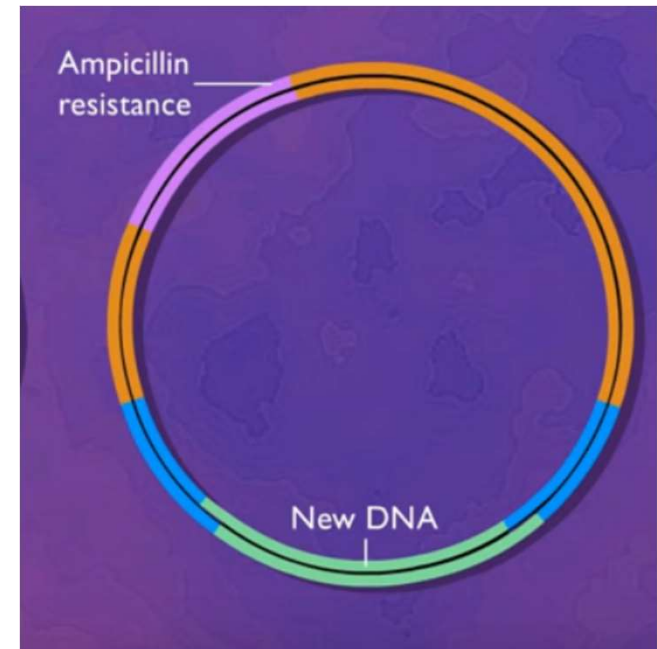


Ligação do gene ao plasmídeo



DNA Ligase

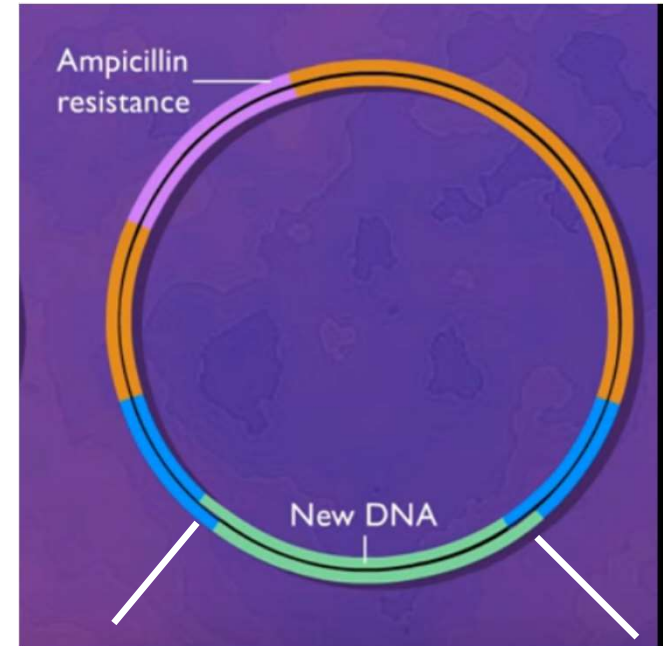
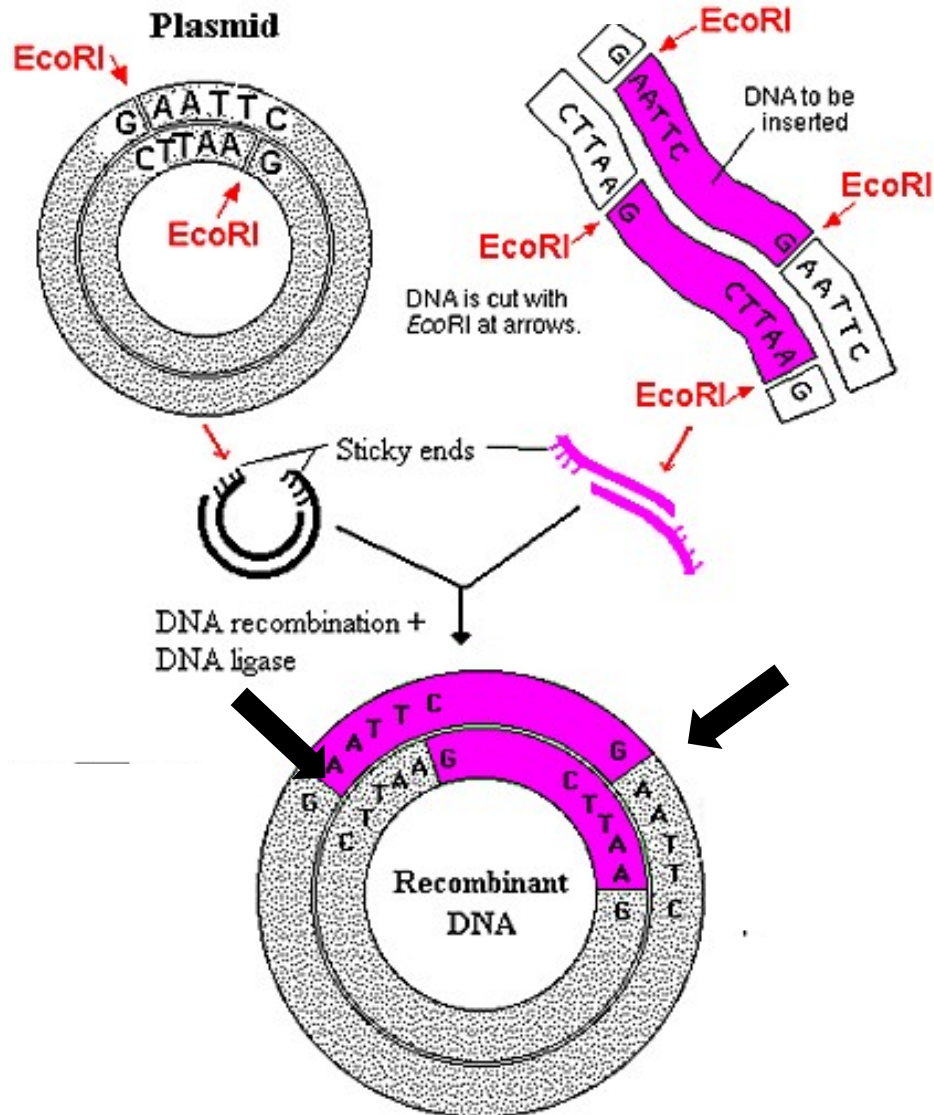
Extremidades coesivas



Plasmídeo Recombinante

O plasmídeo recombinante tem o tamanho do vetor utilizado mais o tamanho do gene inserido

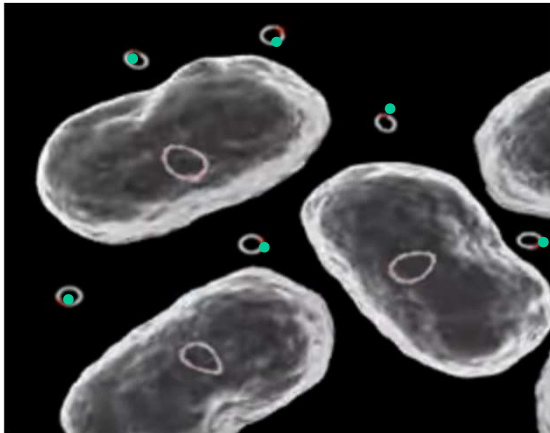
Exemplo



Plasmídeo Recombinante

Notar que, no plasmídeo recombinante, o gene exógeno está flanqueado pelas sequências reconhecidas pela EcoRI.

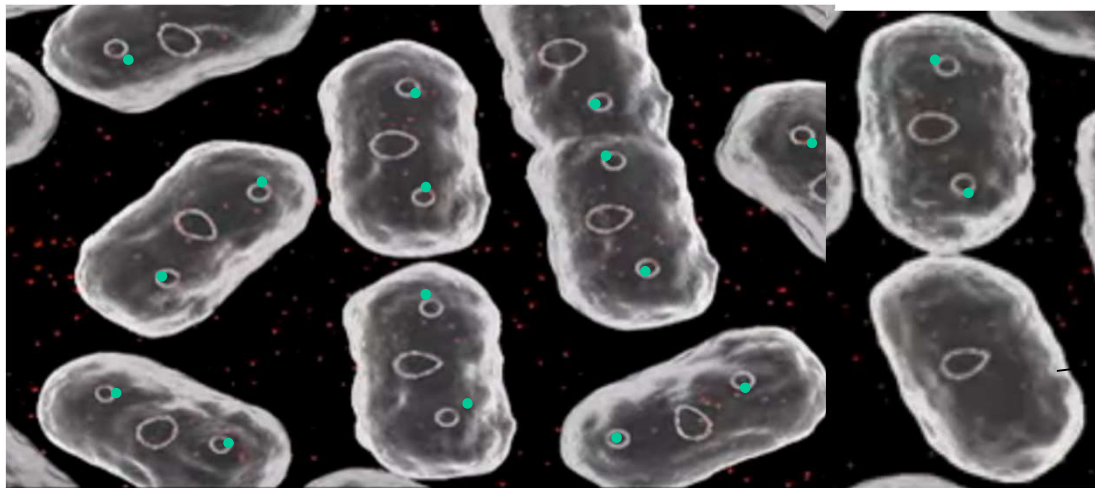
Introdução do Plasmídeo Recombinante em Bactéria



Transformação da bactéria com o plasmídeo recombinante

● Gene

Em seguida, a bactéria se multiplica e o plasmídeo recombinante também



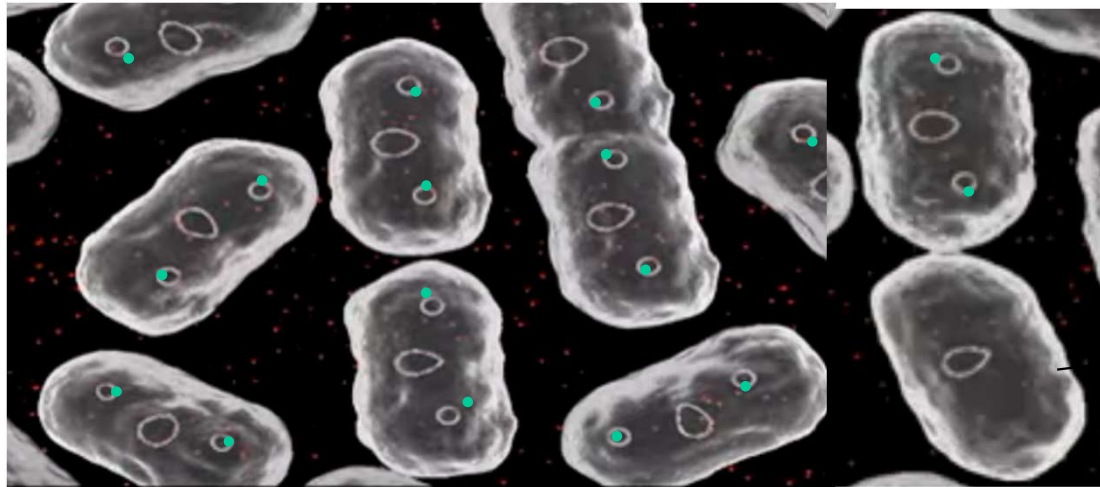
Há bactérias
sem
Plasmídeo

Resultado: o **Gene** se multiplica

Aula prática

Como eliminar bactérias sem plasmídeo?

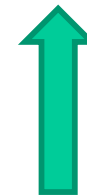
Como selecionar bactérias com plasmídeo?



Bactéria sem
Plasmídeo

Usar o Gene que CONFERE resistência a antibiótico

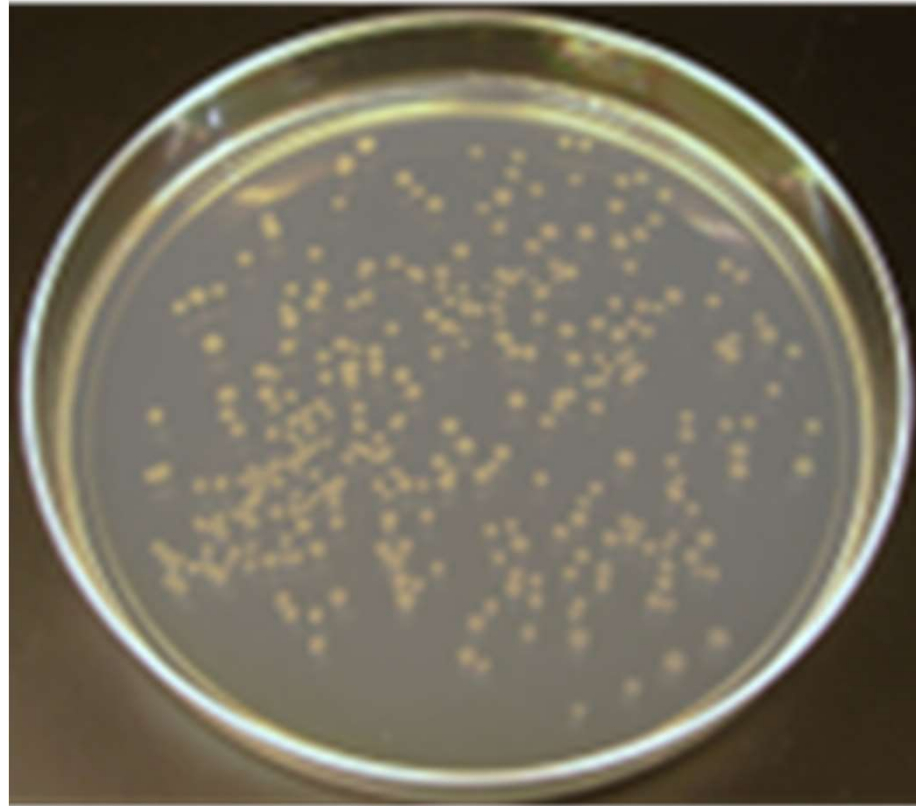
Placas de Petri com Agar + meio nutritivo



Só as bactérias que contém o plasmídeo crescem

Aula prática

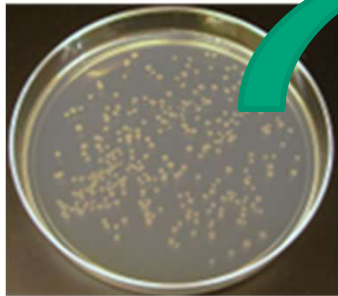
Aspecto da placa



Colônias de bactérias com o gene de interesse

Amplificação da bactéria com o plasmídeo recombinante

Bactérias com plasmídeo recombinante



1 Colônia

Amplificação das bactérias

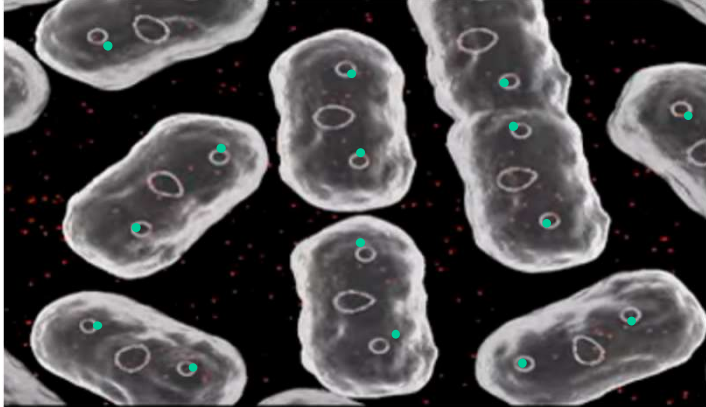


1 alíquota



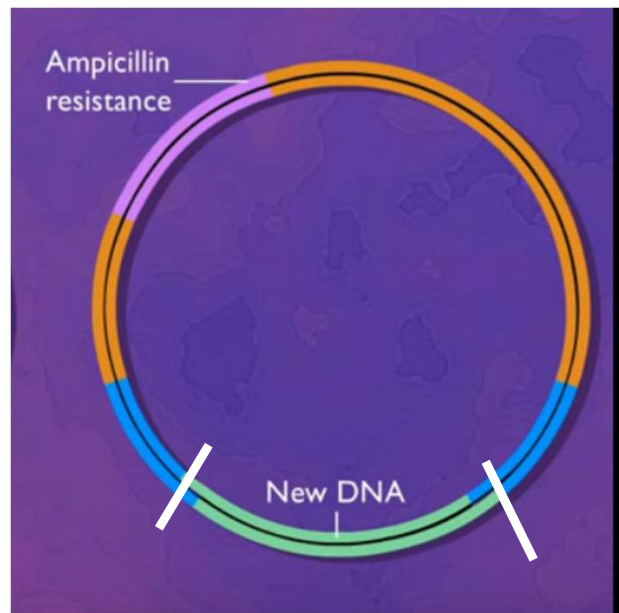
Meio de cultura + AMP

Purificação do DNA plasmidial



1. Centrifugar as bactérias
2. Lise alcalina das bactérias
3. Neutralização com acetato de K.
4. Separação do DNA da bactéria do DNA do plasmídeo recombinante.

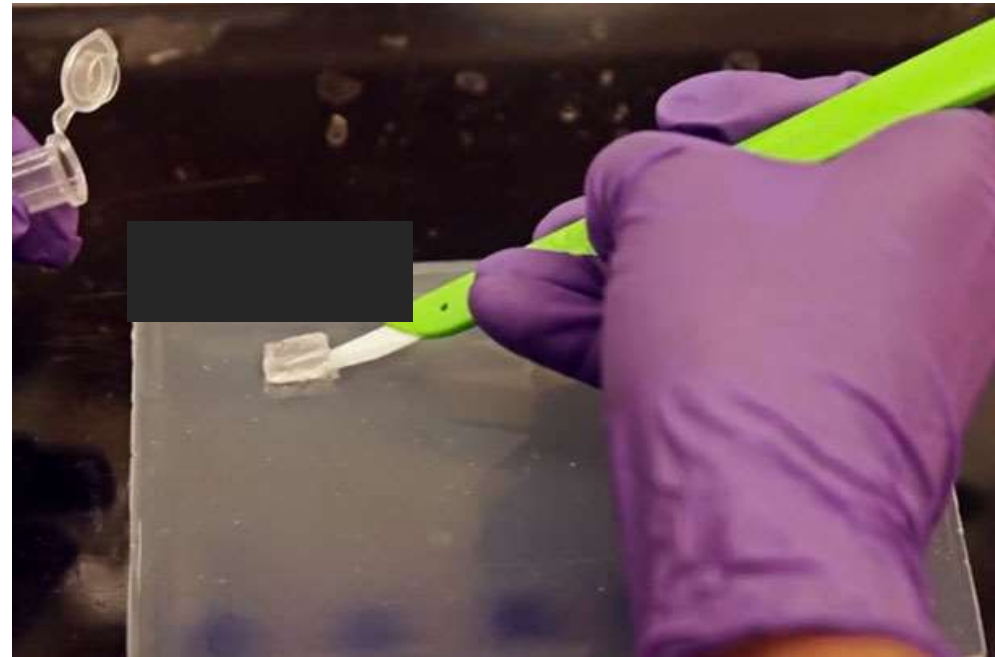
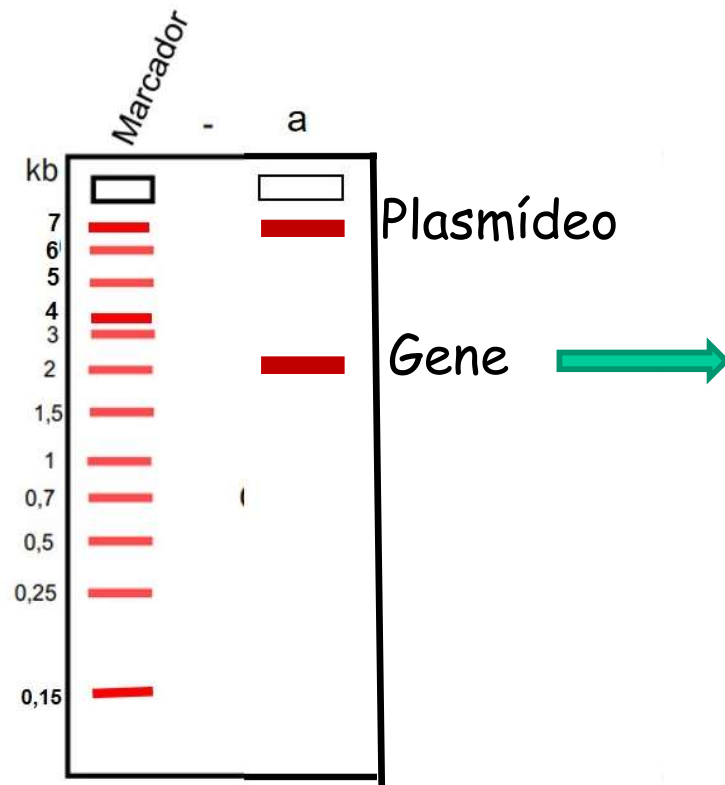
Como retirar o gene de interesse do DNA do plasmídeo?



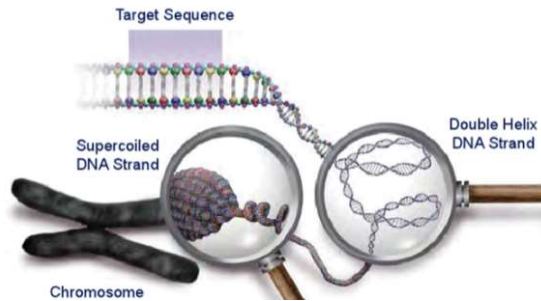
R: Utilizar a Enzima de Restrição original

Como separar o DNA do vetor do DNA do gene de interesse?

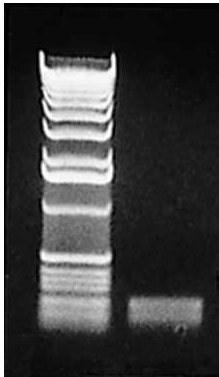
R: Em gel de agarose



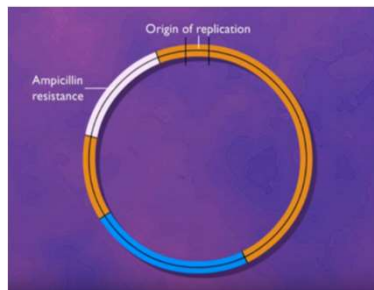
Resumo



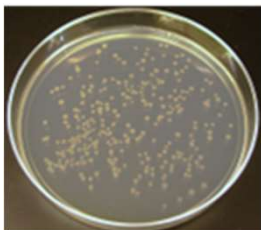
1. Isolar DNA do organismo
2. Amplificar o gene de interesse por PCR (Par de iniciadores!)



3. Análise em gel de agarose
4. Recortar a banda (produto da PCR)
5. Purificar o Produto e adicionar sequências coesivas



6. Cortar o plasmídeo com enzima de restrição
7. Ligar com o produto da PCR



8. Introduzir os plasmídeos na bactéria
9. Selecionar bactérias com o vetor recombinante.

Organismos para amplificar o gene clonado no vetor

- Bactérias (mais usadas)
- Fungos
- Células animais
- Células vegetais

Escolha depende da finalidade

Há que se usar vetores específicos para cada sistema

O que investigar com o gene isolado?

- Sequência nucleotídica
 - Investigar Mutações
 - Definir Exons e Introns
 - Elementos de controle da expressão gênica
 - Comparação da sequência do gene em outros organismos
 - Obtenção de organismos transgênicos
 - Terapia gênica
- Etc. Etc. Etc.