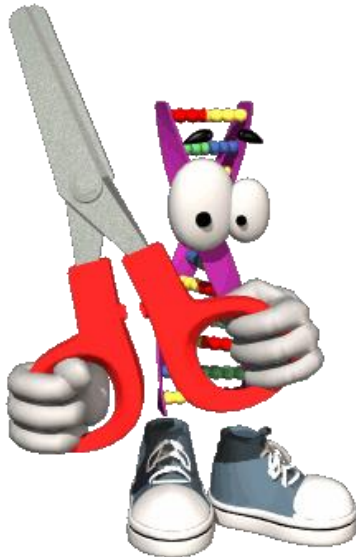


TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE E PCR

Aula 6

LGN0232 – Genética Molecular



Ilara Budzinski
Departamento de Genética
ilara@usp.br

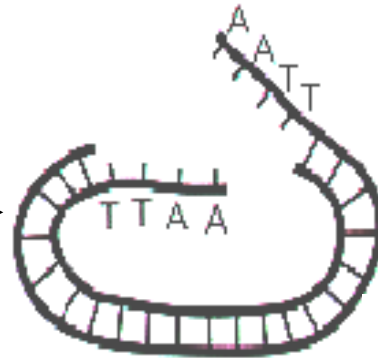
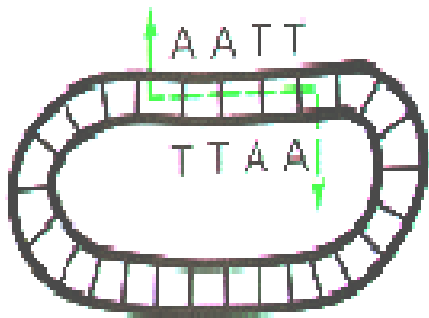
SUMÁRIO

- Ferramentas da tecnologia do DNA recombinante;
- Métodos de transformação bacteriana;
- Seleção de transformantes contendo o DNA recombinante;
- Reação da polimerase em cadeia;
- Sequenciamento de DNA
- Estudo dirigido.

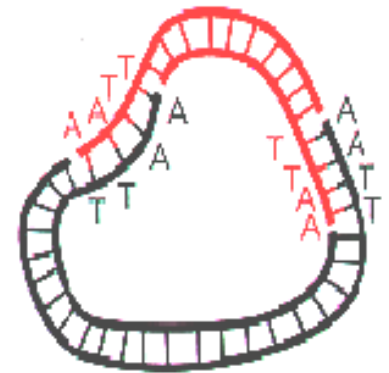
CONSTRUÇÃO DO DNA RECOMBINANTE

Molécula de DNA de um plasmídeo **circular**

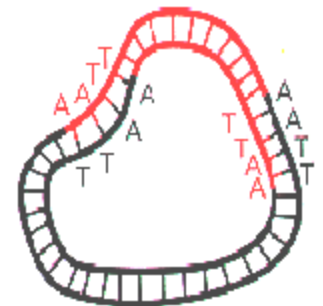
Molécula de DNA de um plasmídeo **linear** com extremidades coesivas



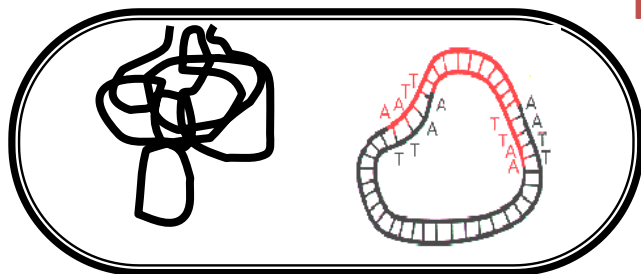
DNA exógeno



Ligação covalente
pela DNA ligase



Inserção em uma célula
hospedeira



Molécula de DNA
plasmidial
contendo o **inserto**



Transformação

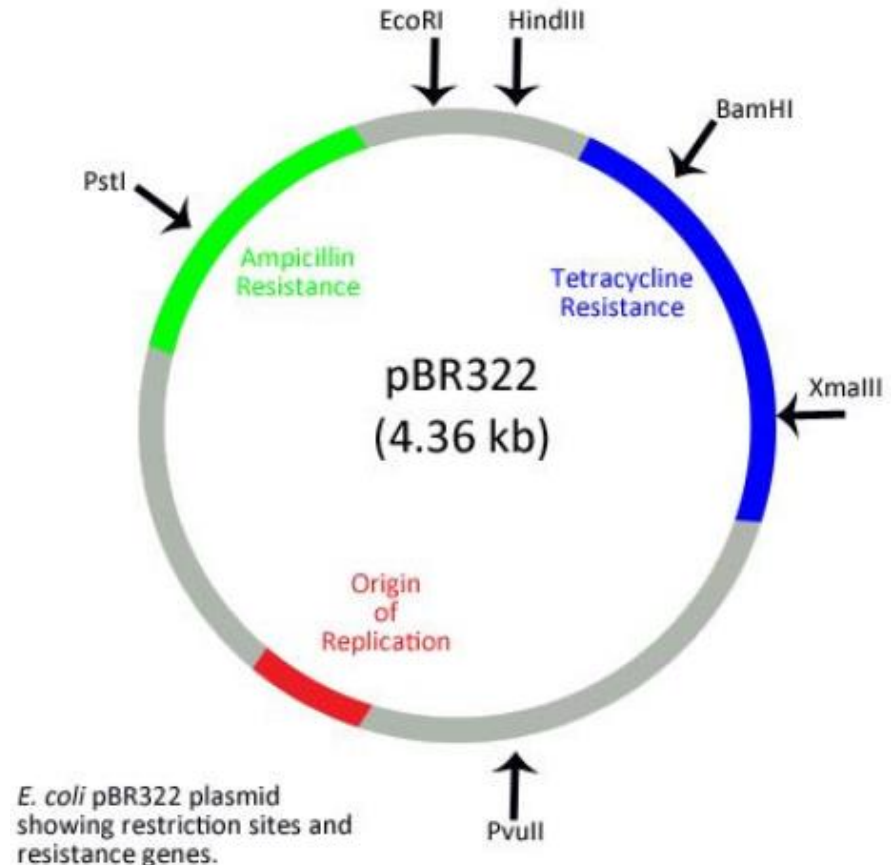
PLASMÍDEOS COMO VETORES DE CLONAGEM

✓ Componentes básicos de um vetor de clonagem plasmidial

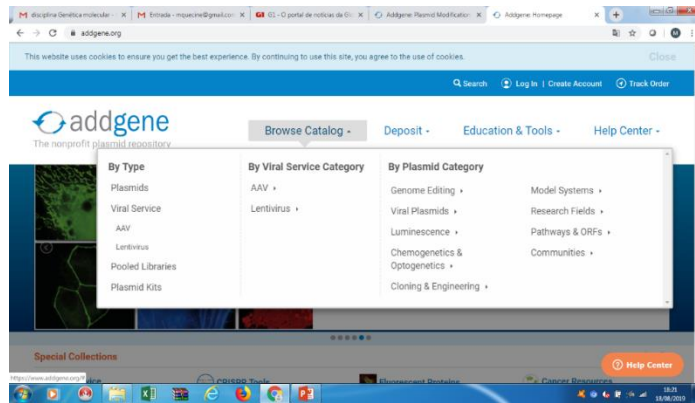
- Os plasmídeos mais usados na tecnologia de DNA recombinante são aqueles que replicam em *E. coli*.

Três regiões essenciais para a clonagem de DNA:

1. Origem de replicação;
2. Marcador que permite seleção, geralmente um gene de resistência ao fármaco;
3. Região na qual fragmentos de DNA exógeno podem ser inseridos.



QUAL PLASMÍDEO DEVO USAR PARA TRANSFORMAR MEU ORGANISMO?



Browse Plasmids by Model Organism



Bacteria



C. elegans



Drosophila



Mammalian



Parasites



Plant



Yeast

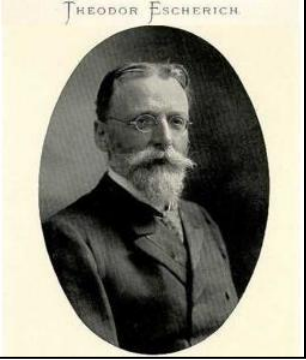


Xenopus



Zebrafish

<https://www.addgene.org/>



Escherichia coli



- Unicelular, na forma de bastão;
- Cresce rapidamente a 37°C ;
 - ciclo de 20 min

Uma geração: 20 minutos



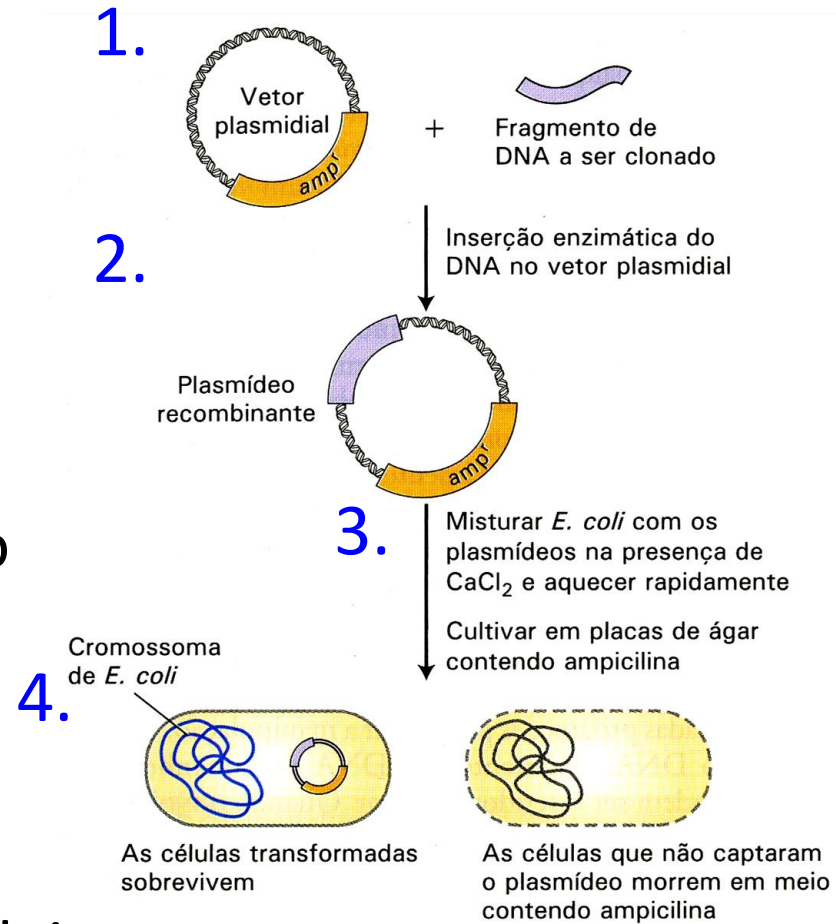
- Pouco exigente quanto a nutrição;
- Meio mínimo ou rico:
 - Glicose - melhor fonte de C
 - Extrato de levedura - vitaminas
 - Triptona e Peptona: fonte aminoácidos



CLONAGEM MOLECULAR

RESUMO DAS ETAPAS:

1. Preparação do vetor e do inserto
2. Ligação do vetor e inserto
3. Transformação em célula hospedeira
4. Seleção de clones



BACTÉRIAS PARA TRANSFORMAÇÃO

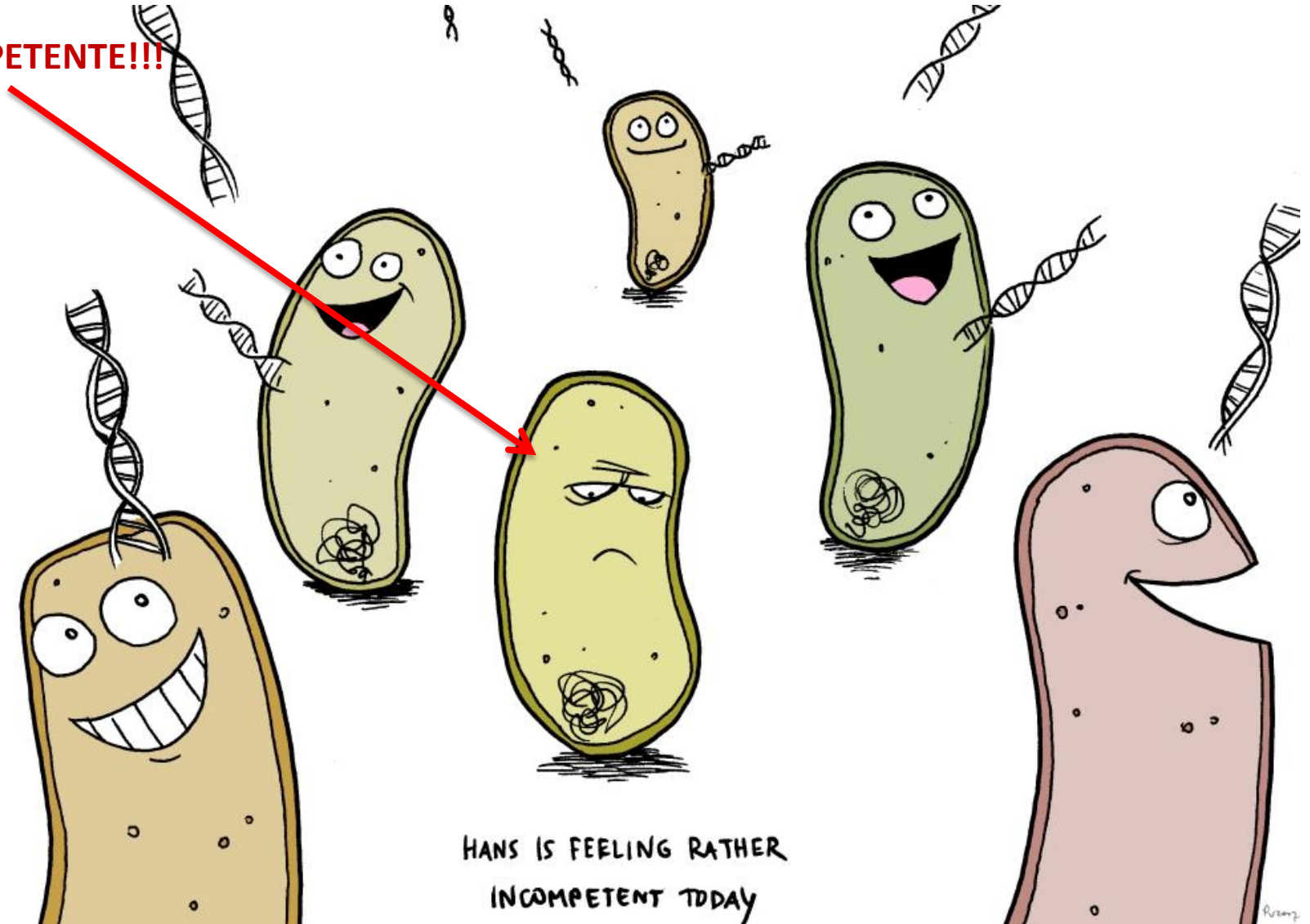
- Hospedeiros
- Não apresentam DNA plasmidial



- **Precisam ser preparadas**
 - Tornar-se competentes = aptas a receberem a molécula de DNA recombinante

CÉLULAS COMPETENTES

INCOMPETENTE!!!

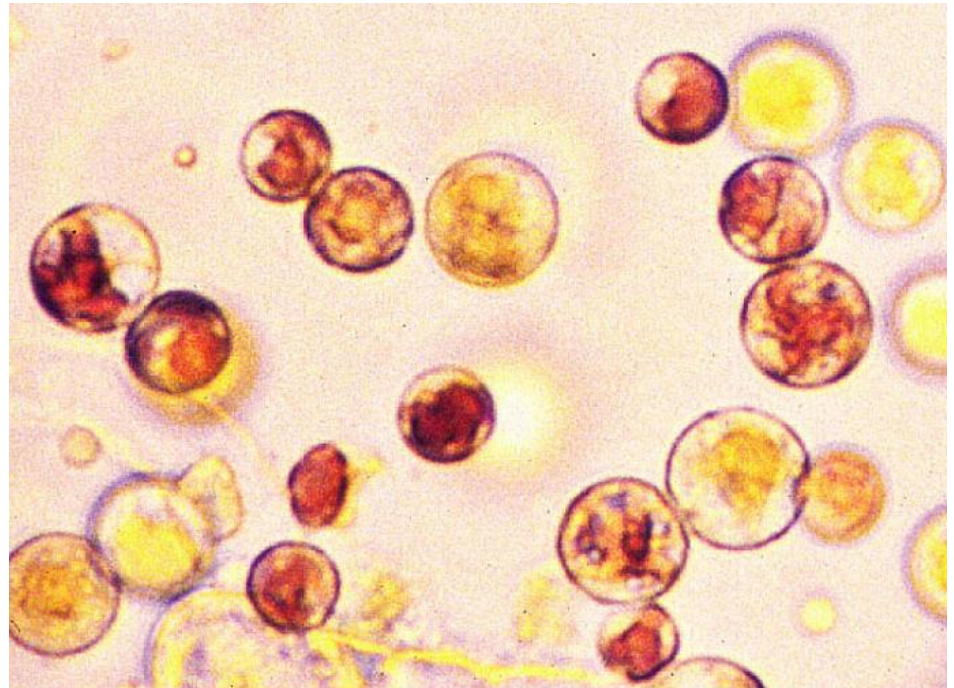


Uma bactéria é **competente** quando tem **a capacidade de receber e multiplicar DNA estranho.**

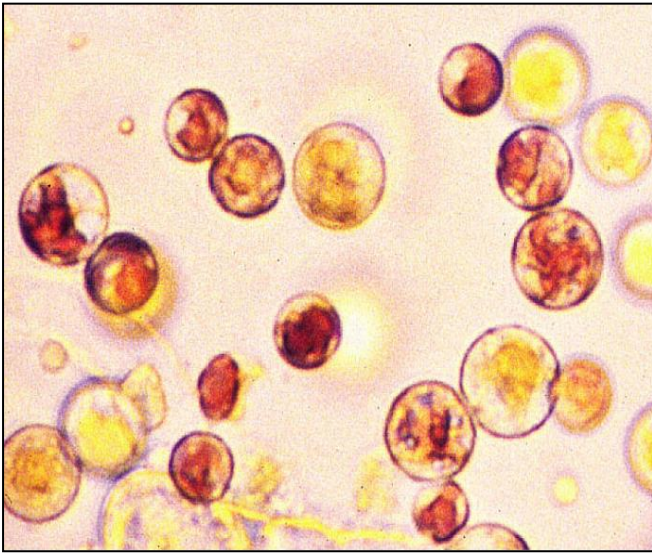
INSERÇÃO DO DNA DENTRO DA CÉLULA BACTERIANA – O HOSPEDEIRO

Métodos de transformação

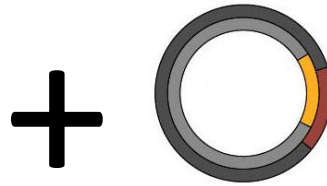
- Transformação química
- Eletroporação



TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA

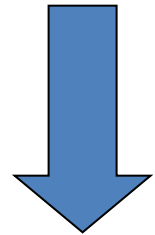


Suspensão de células competentes

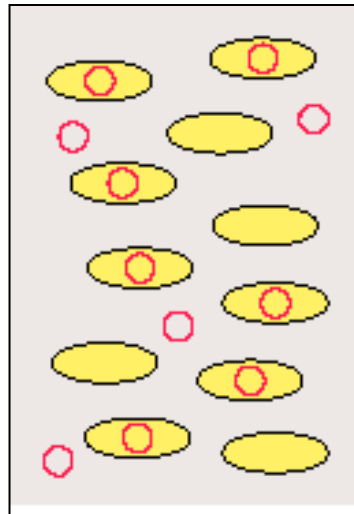
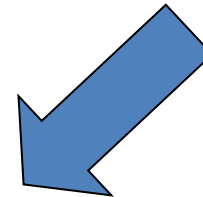


Moléculas de DNA recombinante

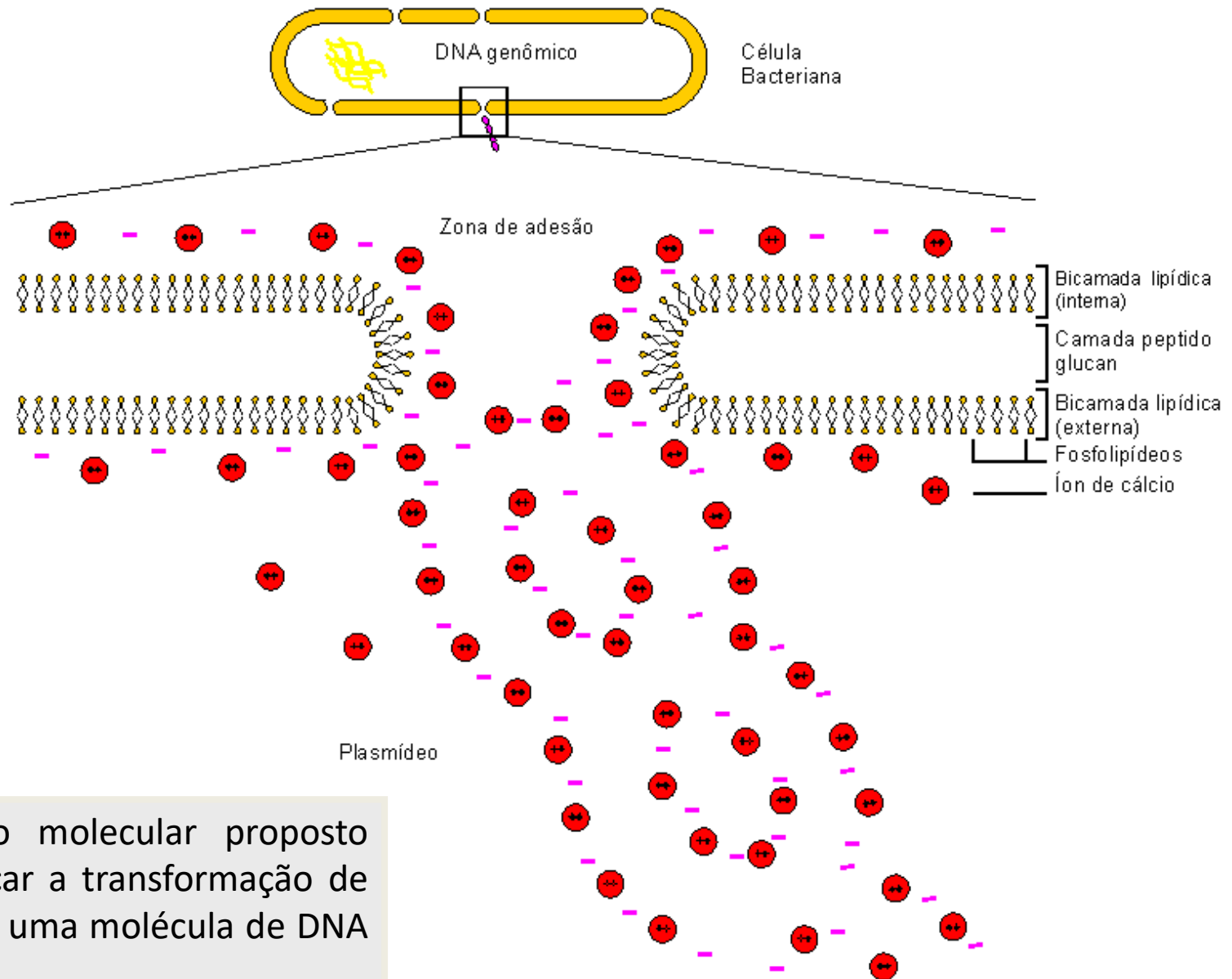
= Incubar 30 min
no gelo



Choque térmico
(42°C/30 s)



TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA



Mecanismo molecular proposto para explicar a transformação de *E. coli* com uma molécula de DNA exógeno.

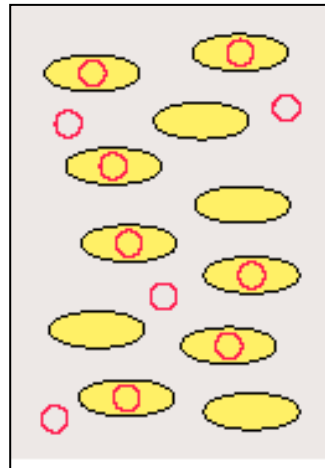
Mandel e Higa, 1970

ELETROPORAÇÃO



Eletroporador

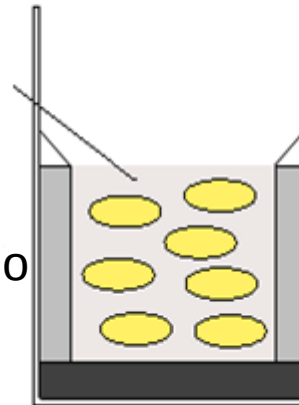
Suspensão de células



Eletrodo

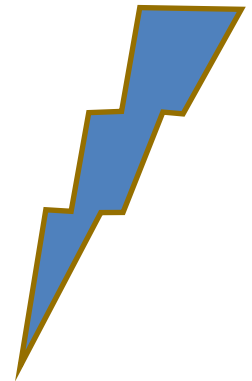


Cuveta

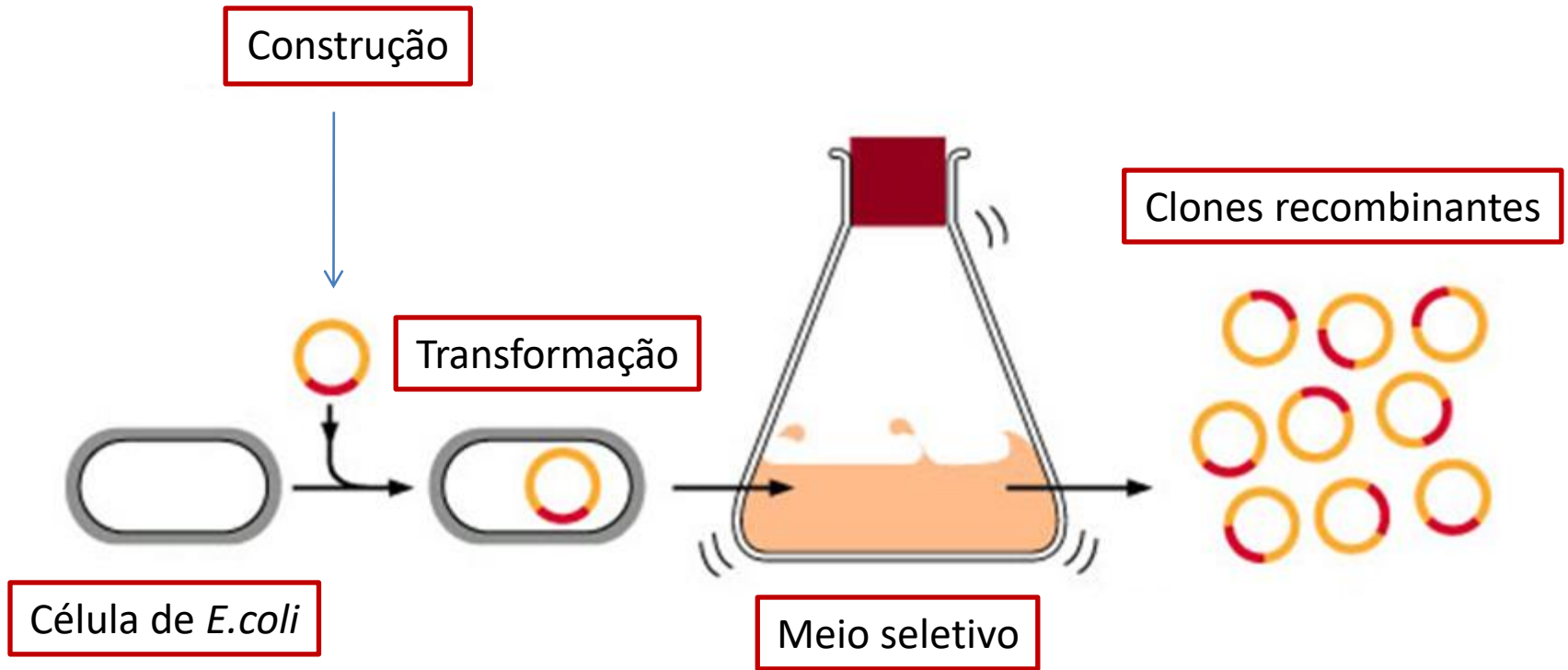


Eletrodo

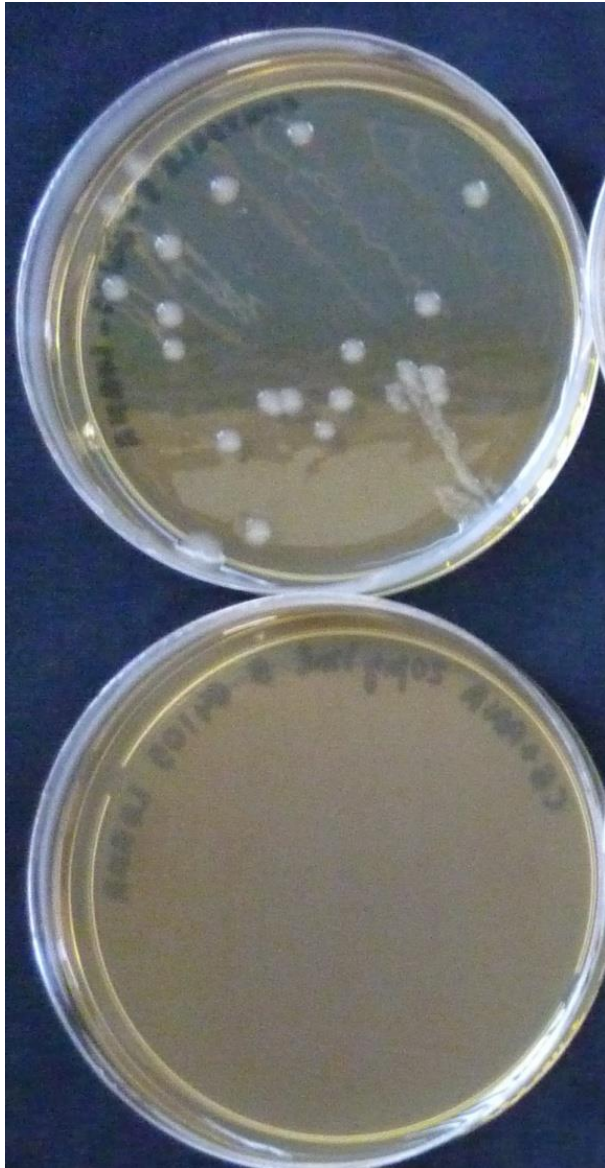
Pulso elétrico



SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES



MC + ampicilina



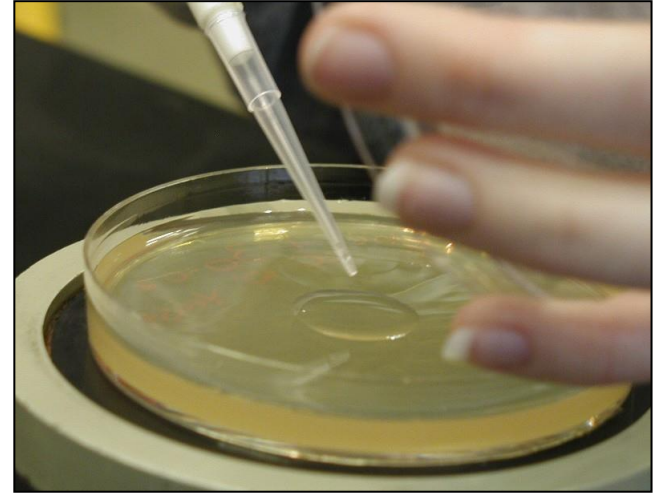
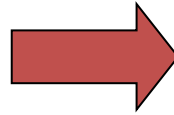
Células transformadas

Clones resistentes a ampicilina

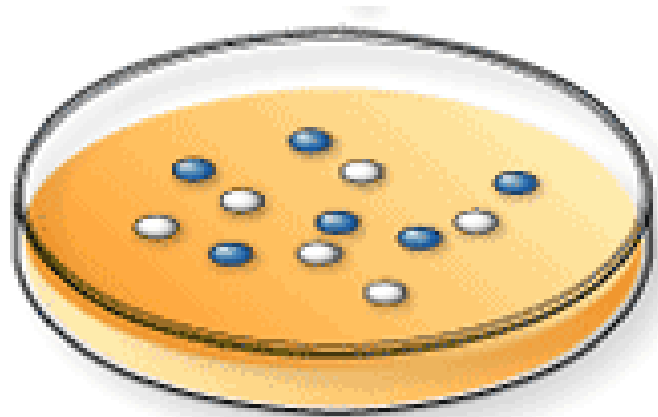
Células controle (não transformadas)

Clones sensíveis a ampicilina

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES



MC+X-gal+ampicilina



Período de incubação
12-16h / 37°C)

*MC = Meio de cultura

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

➤ Podem ser também utilizados marcadores que são inativados com a inserção do DNA estranho no plasmídio.

Exemplo: sistema de diferenciação branco-azul

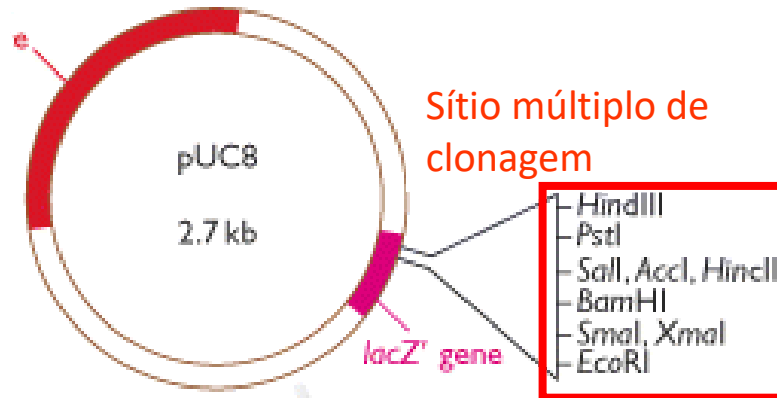
- Plasmídios da série pUC possuem um gene (gene *lacZ*) que codifica a produção da enzima β -galactosidase. A inserção do DNA estranho no sítio de clonagem do plasmídeo causa a interrupção do gene, levando à perda da função da β -galactosidase.

Como resultado:

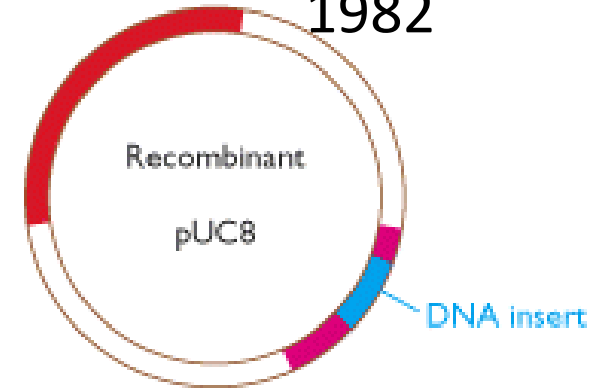
- colônias brancas (β -gal inativa) - positivas (com inserto)
- colônias azuis (β -gal ativa) - negativas (sem inserto)

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

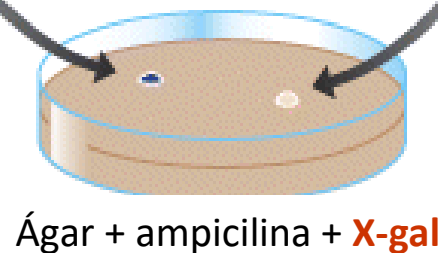
Gene de resistência à
ampicilina



pUC8
Vieira & Messing,
1982



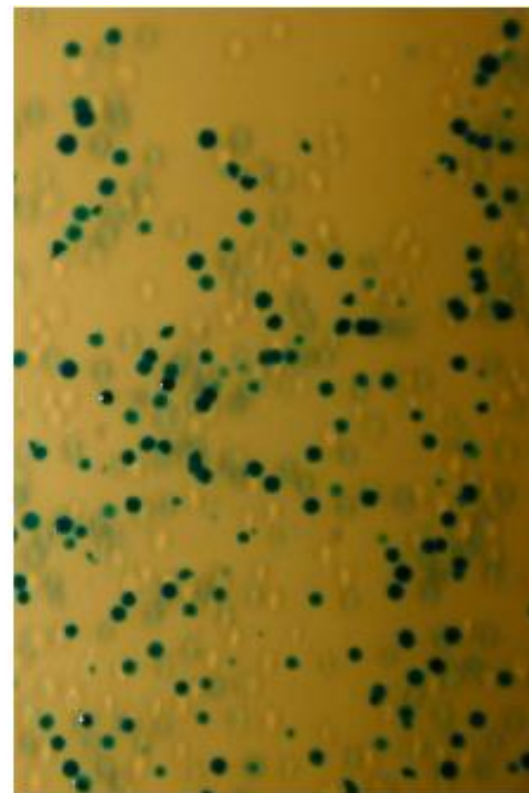
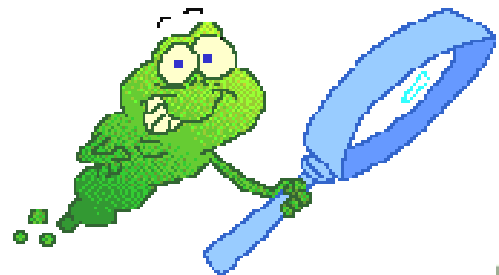
Produção da enzima β -galactosidase
X-gal é clivado = **colônia azul**



Não há produção da enzima β -galactosidase
X-gal não é clivado = colônia
branca

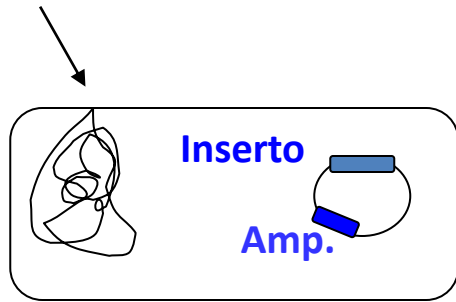
Gene *lacZ* = codifica a enzima β -galactosidase

Quais colônias nos interessam e por quê?



POSSÍVEIS RESULTADOS APÓS A ETAPA DE TRANSFORMAÇÃO

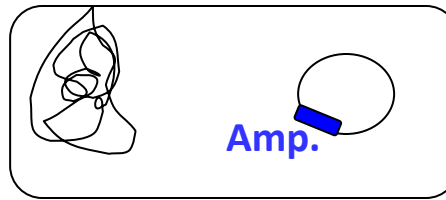
Célula bacteriana



MC+X-gal+amp



Plasmídeo com inserto

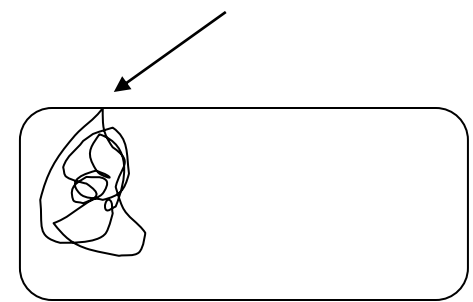


MC+X-gal+amp



Plasmídeo sem inserto

DNA cromossomal



MC+X-gal+amp



Sem plasmídeo

✓ Resistência à ampicilina

✓ *LacZ* não funcional

✓ **Colônias brancas**

✓ Resistência à ampicilina

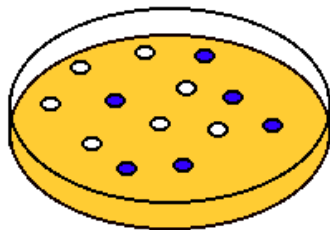
✓ *LacZ* funcional

✓ **Colônias azuis**

✓ **Sem** resistência à ampicilina

✓ **Sem** gene *LacZ*

✓ **Sem** crescimento

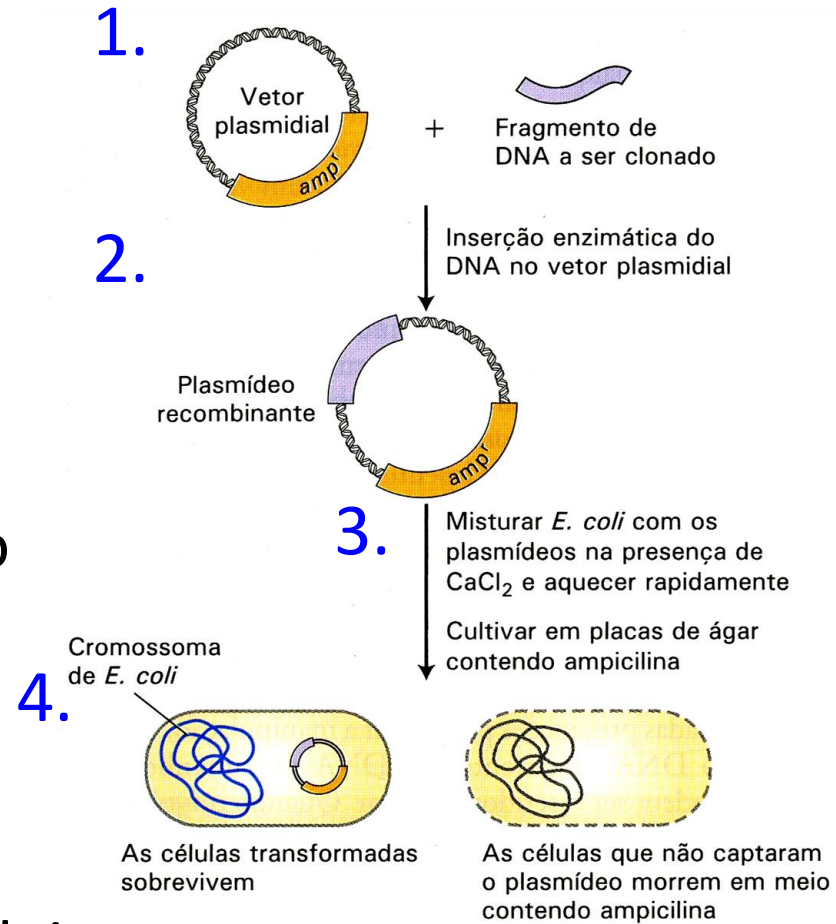


*MC = Meio de cultura

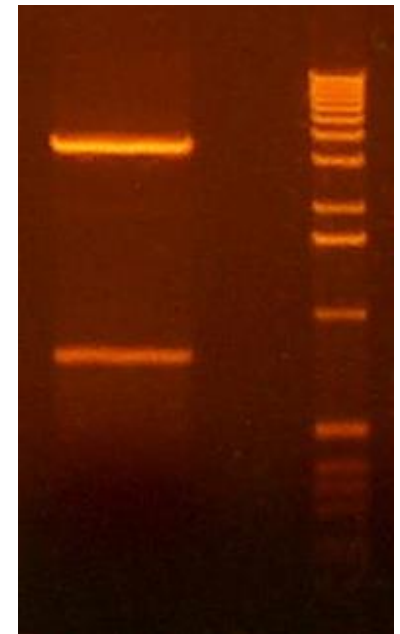
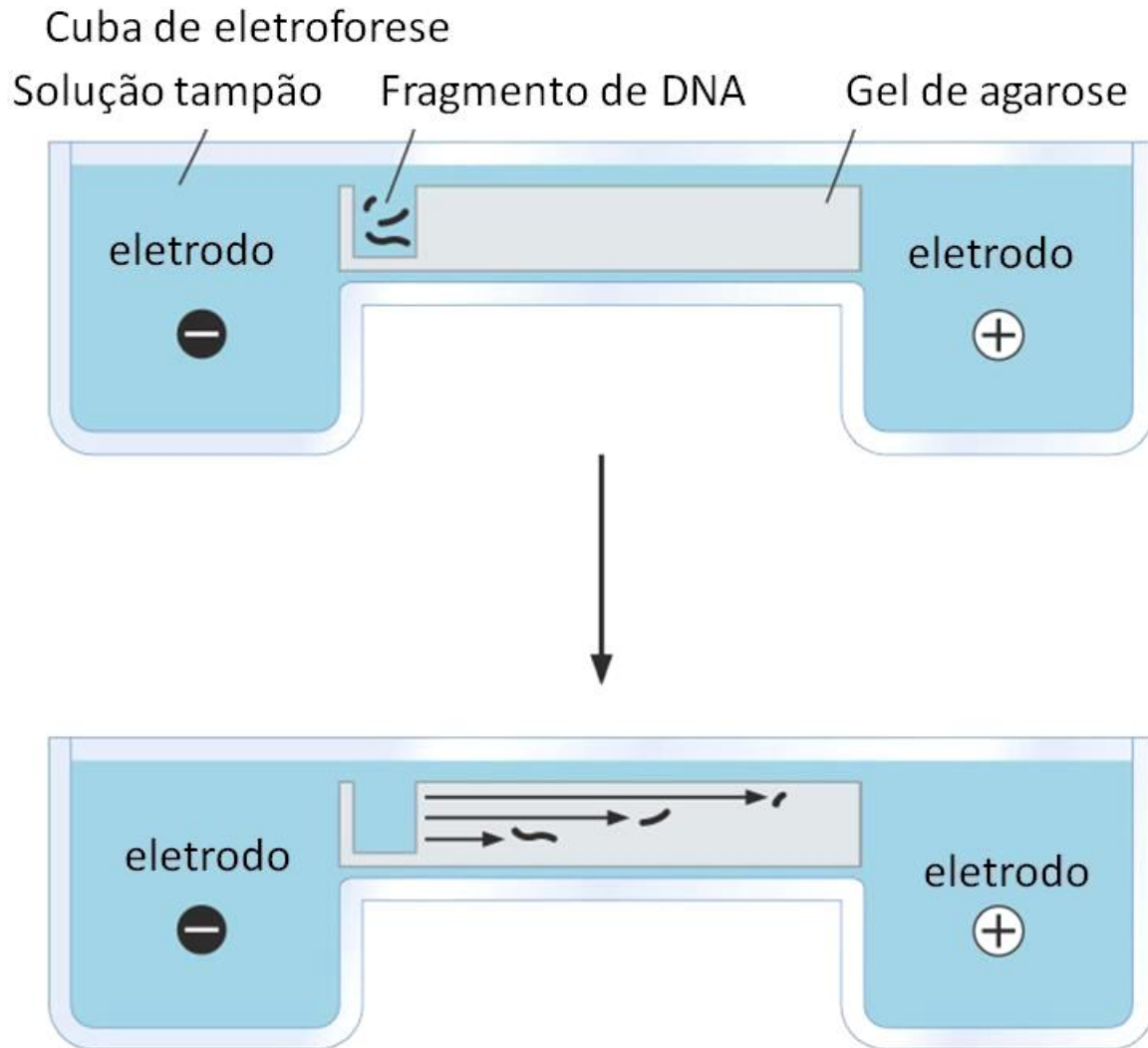
CLONAGEM MOLECULAR

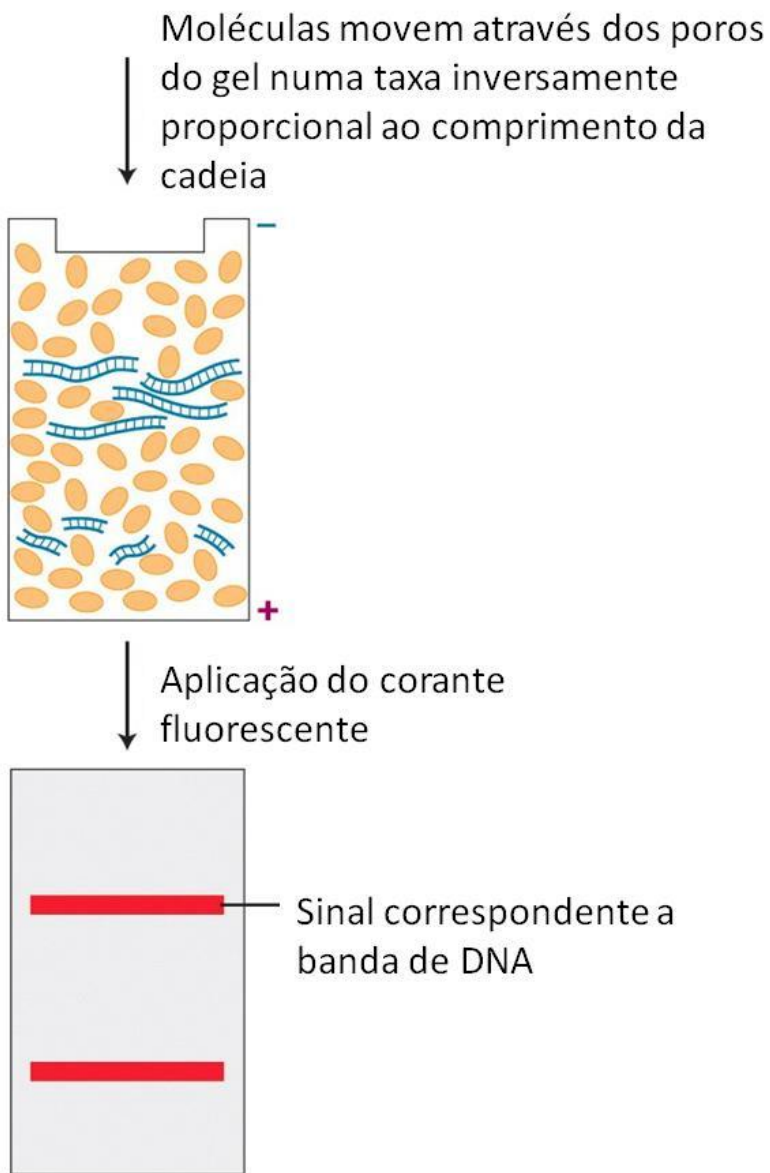
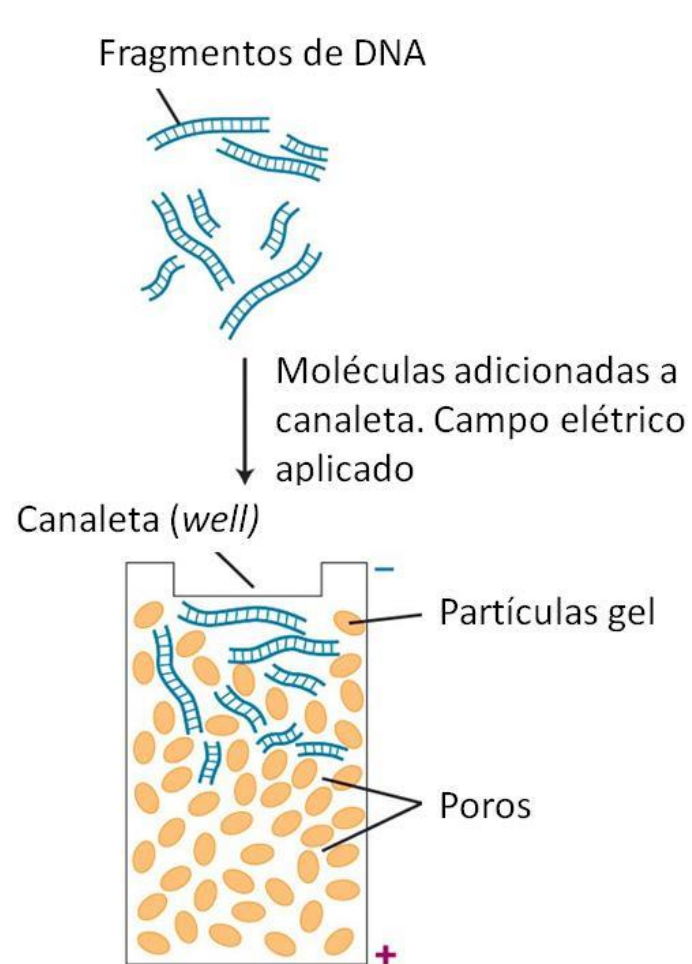
RESUMO DAS ETAPAS:

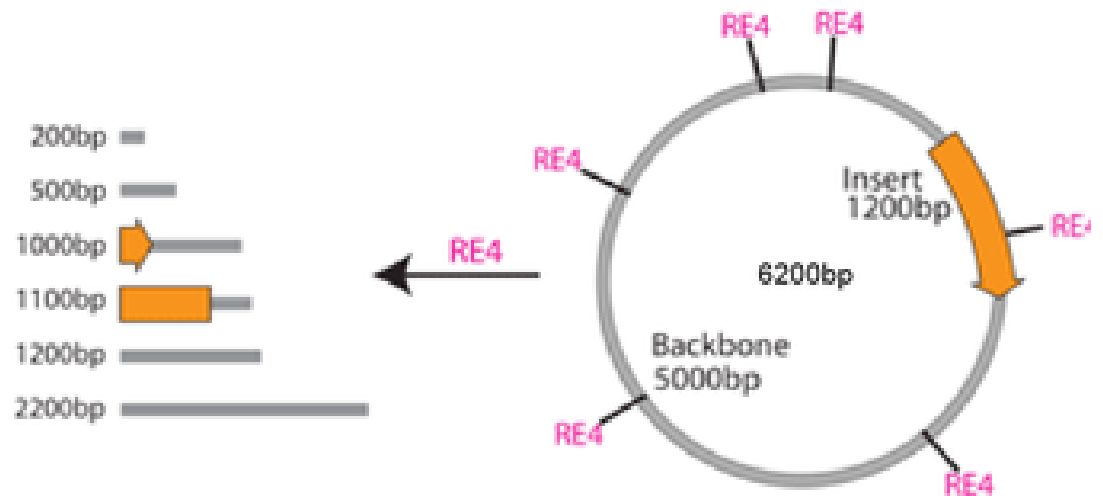
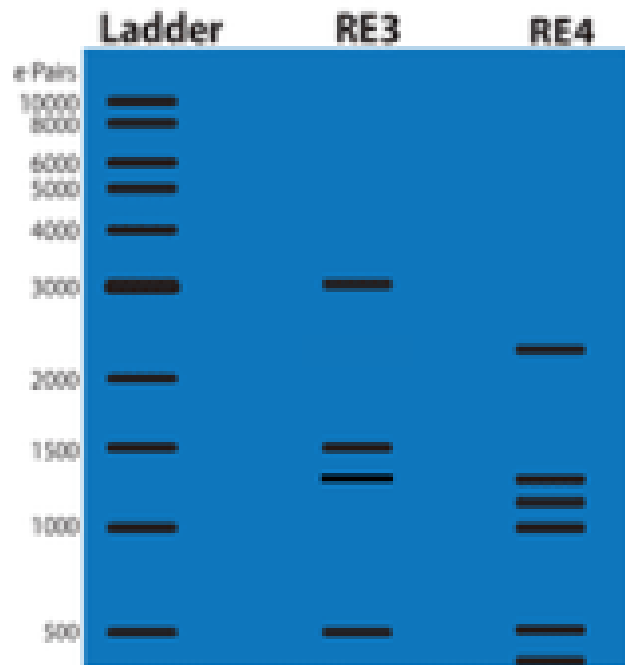
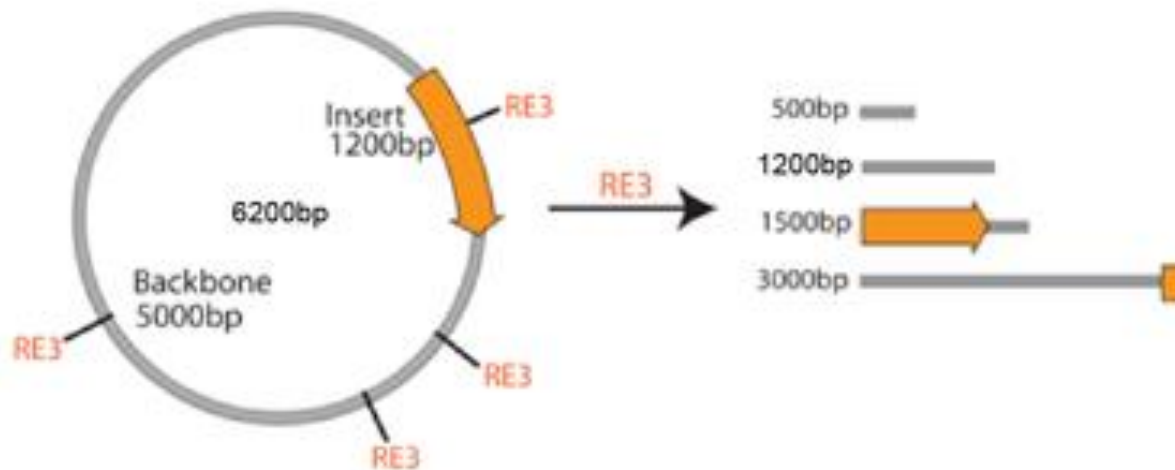
1. Preparação do vetor e do inserto
2. Ligação do vetor e inserto
3. Transformação em célula hospedeira
4. Seleção de clones



ELETOFORESE







DNA GENÔMICO É DIFERENTE...MILHARES, BILHÕES DE PARES DE BASES...

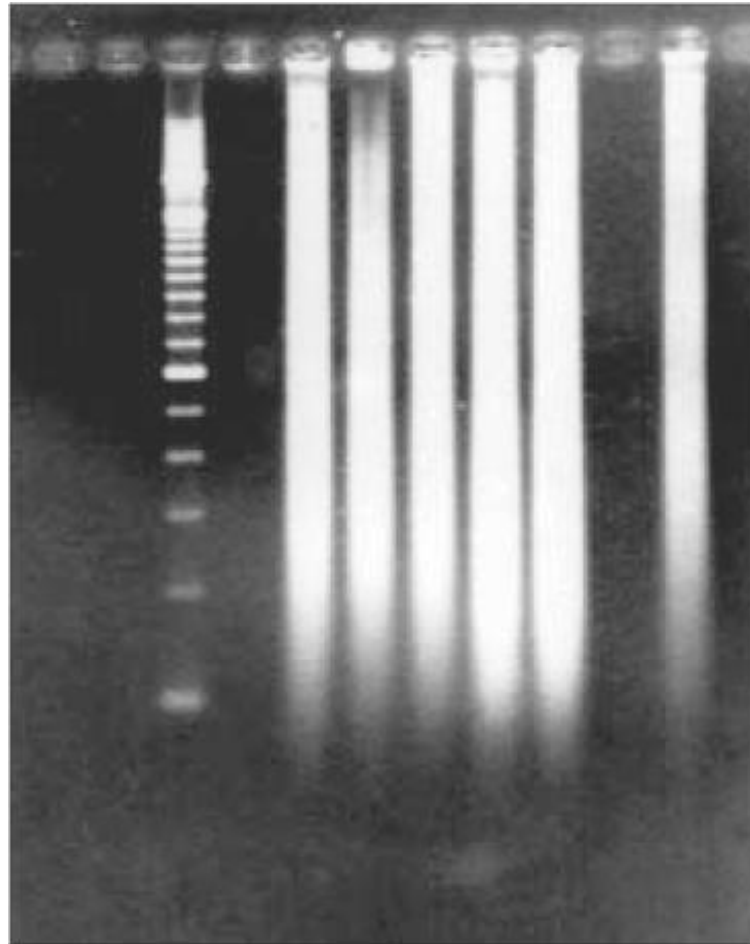


Figura 1 – Amostras de DNA total, extraídas de fragmentos de leiomiomas uterinos embebidos em parafina e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%

CLONAGEM CELULAR



CÓPIAS IDÊNTICAS!!

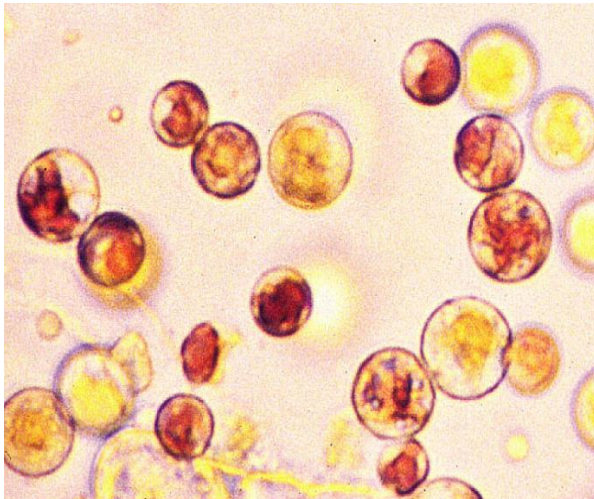
Clone: uma coleção de moléculas ou células, todas idênticas a uma molécula ou célula original.



CLONAGEM MOLECULAR

O termo clonagem de DNA se refere à produção de várias cópias idênticas de uma sequência de DNA.

Dependente de
células vivas



Independente de
células vivas (PCR)



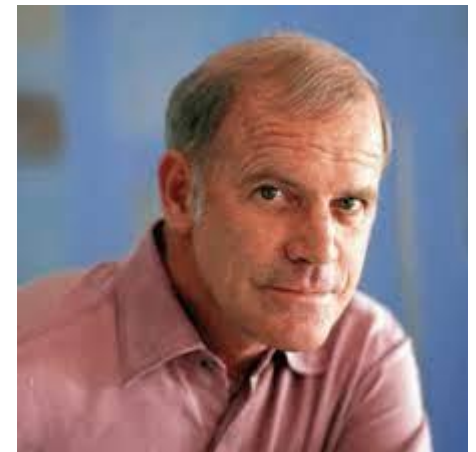
CLONAGEM MOLECULAR INDEPENDENTE DE CÉLULAS VIVAS PCR



PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

- O processo de PCR foi **inventado** por Kary Mullis no início da década de 80 → Nobel de Química em 1993.
- É um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA **sem** o uso de um organismo vivo, por exemplo, *Escherichia coli* (bactéria) ou leveduras.

É uma técnica rotineira de laboratório usada para fazer muitas cópias (milhões ou bilhões) de uma região específica do DNA.



If the K-T boundary isotopic spike is indeed the result of impact-related acid rain, the oceanic strontium isotope record may reveal other large impacts. The seawater strontium curve of Burke *et al.* (9), which spans the past 500 million years, shows at least two other prominent high spikes in the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio, one in the mid-Cretaceous, at ~ 100 million years, and the other in the Pennsylvanian, at ~ 290 million years. The first appears to precede by a few million years the mass extinction event at the Cenomanian-Turonian boundary. There is also a large increase in $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ across the Permian-Triassic boundary (9), the time of the most extreme mass extinction in the Phanerozoic record (17). However, the increase appears to be rather gradual, extending over 20 million to 25 million years, and is thus quite different in character from the K-T spike. Nevertheless, data are sparse for this interval, and more work will be required to determine the exact nature of the increase.

The occurrence of a spike toward higher values in the seawater $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ record at the K-T boundary is tantalizing evidence for

18. I thank many colleagues at Scripps for comments on the ideas expressed in this report, in particular G. Arrhenius, S. Galer, J. Gieskes, M. Kastner, D. Lal, G. Lugmair, and H.-G. Stosch. Comments from two anonymous reviewers also improved the original manuscript. I thank P. Hey for preparation of

the manuscript. This work was supported in part by grants from the National Science Foundation and the National Aeronautics and Space Administration.

28 September 1987; accepted 7 December 1987

Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase

RANDALL K. SAIKI, DAVID H. GELFAND, SUSANNE STOFFEL, STEPHEN J. SCHARF, RUSSELL HIGUCHI, GLENN T. HORN, KARY B. MULLIS,* HENRY A. ERLICH

A thermostable DNA polymerase was used in an in vitro DNA amplification procedure, the polymerase chain reaction. The enzyme, isolated from *Thermus aquaticus*, greatly simplifies the procedure and, by enabling the amplification reaction to be performed at higher temperatures, significantly improves the specificity, yield, sensitivity, and length of products that can be amplified. Single-copy genomic sequences were amplified by a factor of more than 10 million with very high specificity, and DNA segments up to 2000 base pairs were readily amplified. In addition, the method was used to amplify and detect a target DNA molecule present only once in a sample of 10^5 cells.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." *Science* 239 (1988): 487-491.

Thermus aquaticus

Thermus aquaticus é uma bactéria termófila que pode suportar temperaturas elevadas. É a fonte da enzima resistente ao calor como a **Taq polimerase** de DNA, uma das mais importantes enzimas na biologia molecular devido à sua utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica de amplificação de DNA.



Thermus aquaticus

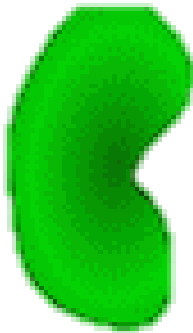
A bactéria foi descoberta pela primeira vez no Lower Geyser Basin do Parque Nacional de Yellowstone



REAÇÃO DE PCR



DNA molde



DNA polimerase

H_2O + tampão



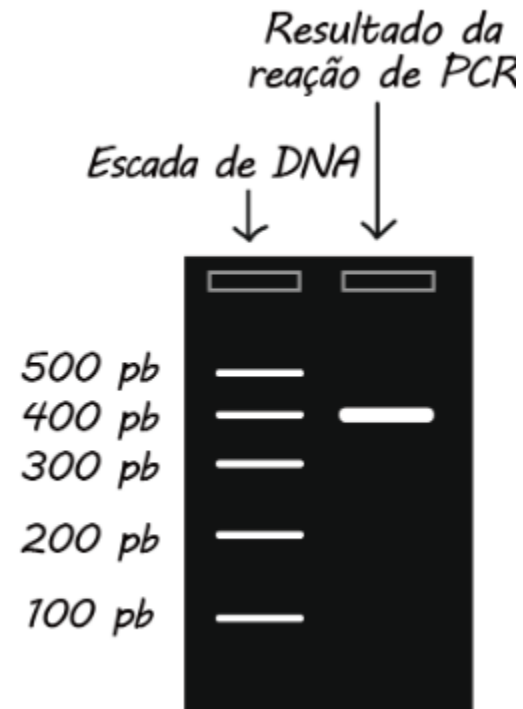
primers

A T C G

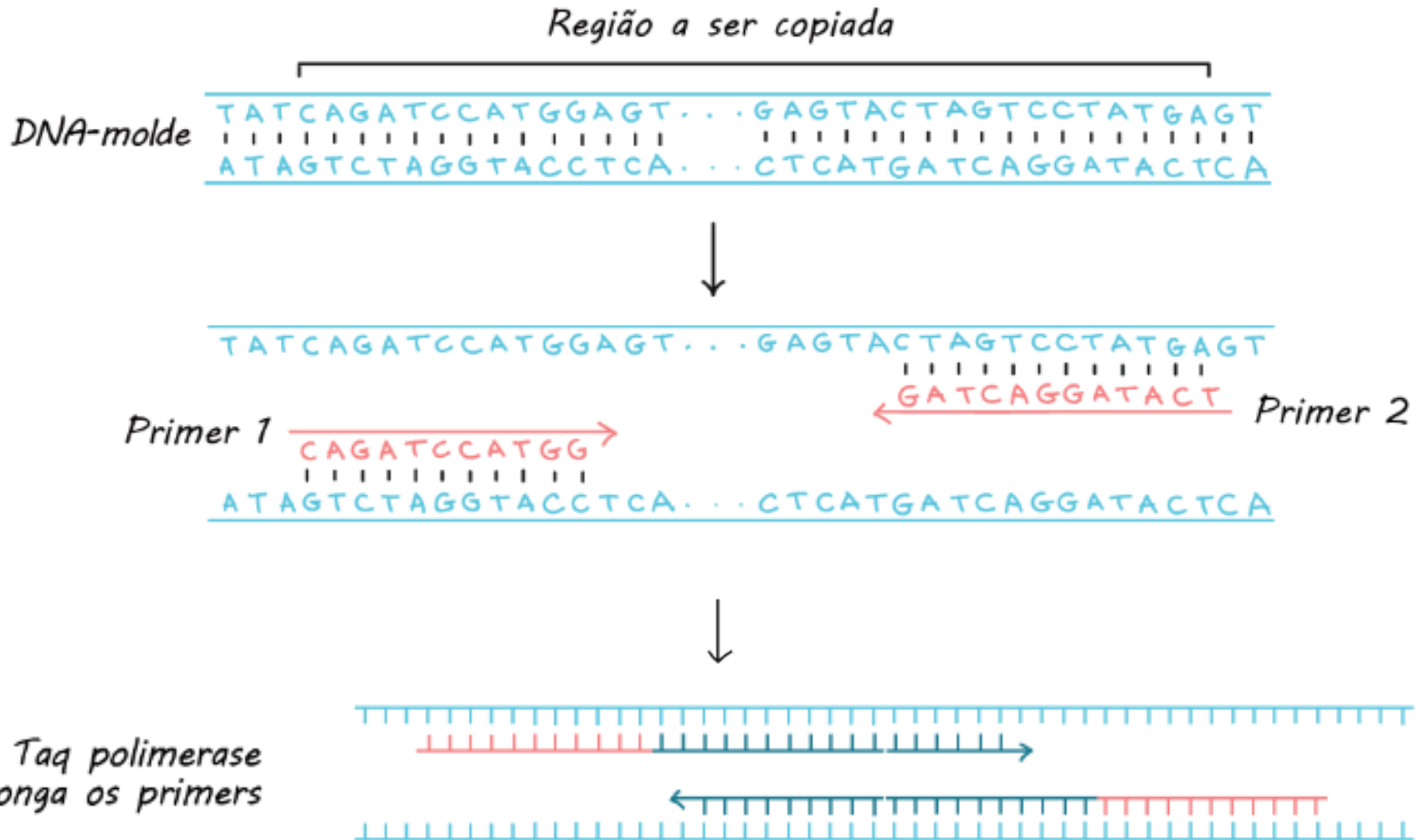
nucleotídeos

Primers de PCR

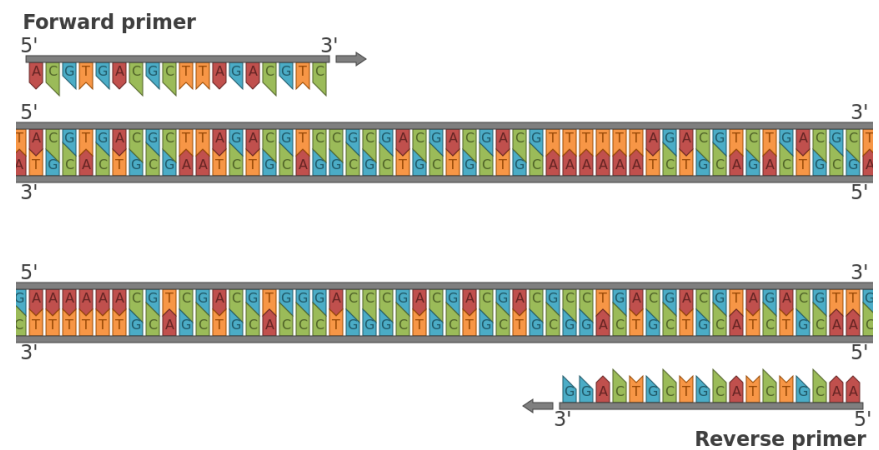
- A *Taq* polimerase (DNA polimerase) consegue fabricar DNA somente a partir de um **primer** (sequência curta de nucleotídeos que fornece um ponto de partida (OH livre) para a síntese de DNA).
- Os primers de PCR são **pedaços curtos de DNA de fita simples**, geralmente por volta de 20 nucleotídeos de comprimento. Dois primers são usados para cada reação de PCR, e eles são projetados de modo que englobem a região de interesse (região que deve ser copiada).



Primers de PCR



DESENHO DE *PRIMERS*:



USP Mail: Entrada x Mqentra - mqentra@gmail.com x Online Analysis Tools - PC x

molbiol-tools.ca/PCR.htm

DESIGN PCR PRIMERS

BACKGROUND INFORMATION: For sites describing PCR theory, as well as companies marketing PCR products you might want to begin by visiting [Highveld](#). For PCR techniques see [PCRlink.com](#).

There are several excellent sites for designing PCR primers:

- [Primer3: WWW primer tool](#) (University of Massachusetts Medical School, U.S.A.) – This site has a very powerful PCR primer design program permitting one considerable control over the nature of the primers, including size of product desired, primer size and Tm range, and presence/absence of a 3'-GC clamp.
- [GeneFisher - Interactive PCR Primer Design](#) (Universitat Bielefeld, Germany) - a very good site allowing great control over primer design.
- [PCR Now](#) (Computational Biology Group, PathoGene, Southwestern Medical Center, U.S.A.) - created to design Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) primers for any number of user-defined coding sequences. Great control over primer properties. If you are interested in designing primers specific to published organismal or viral genes see the related site [PathoGene](#).
- [Primer3Plus](#) - a new improved web interface to the popular Primer3 primer design program (Reference: A. Untergasser et al. 2007. Nucl. Acids Res. 35(Web Server issue):W71-W74)
- [BiSearch](#) Primer Design and Search Tool - this is a useful tool for primer-design for any DNA template and especially for bisulfite-treated genomes. The ePCR tool provides fast detection of mispriming sites and alternative PCR products in cDNA libraries and native or bisulfite-treated genomes. (Reference: Arányi T et al. 2006. BMC Bioinformatics 7: 431).
- [Primer-BLAST](#) was developed at NCBI to help users make primers that are specific to the input PCR template. It uses [Primer3](#) to design PCR primers and then submits them to BLAST search against user-selected database. The blast results are then automatically analyzed to avoid primer pairs that can cause amplification of targets other than the input template.
- [MFEprimer-2.0](#) allows users to check primer specificity against genomic DNA and messenger RNA/complementary DNA sequence databases quickly and easily. This server uses a k-mer index algorithm to accelerate the search process for primer binding sites and uses thermodynamics to evaluate binding stability between each primer and its DNA template. Several important characteristics, such as the sequence, melting temperature and size of each amplicon, either specific or non-specific, are reported. (Reference: Qu W et al. 2012. Nucl. Acids Res. 40 (Web Server issue): W205-W208)
- [Primer Design and Search Tool](#)
- [PrimerDesign-M](#) - includes several options for multiple-primer design, allowing researchers to efficiently design walking primers that cover long DNA targets, such as entire HIV-1 genomes, and that optimizes primers simultaneously informed by genetic diversity in multiple alignments and experimental design constraints given by the user. PrimerDesign-M can also design primers that include DNA barcodes and minimize primer dimerization. PrimerDesign-M finds optimal primers for highly variable DNA targets and facilitates design flexibility by suggesting alternative designs to adapt to experimental conditions. (Reference: Yoon H & Leitner T. 2015. Bioinformatics 31:1472-1474).

15:41
20/08/2016

Etapas da PCR

1. Desnaturação (94-96°C, 30-600 s).

A dupla fita do DNA é separada (desnaturada) em duas fitas simples e atuarão como **molde**.

******A DNA polimerase usada é a *Taq polimerase* (estável em altas temperaturas).

2. Anelamento (pareamento, hibridização) (45-80°C, 30-120 s).

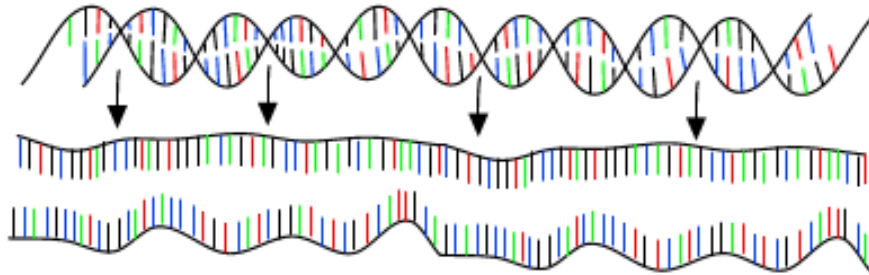
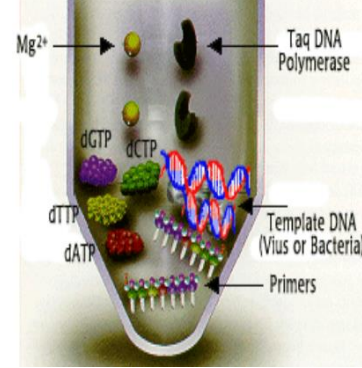
Nesta etapa os iniciadores (primers) ligam-se ao DNA de cadeia simples (por complementariedade) e a DNA polimerase liga-se aos iniciadores emparelhados.

3. Alongamento (polimerização) (65-80°C, 30-120 segundos).

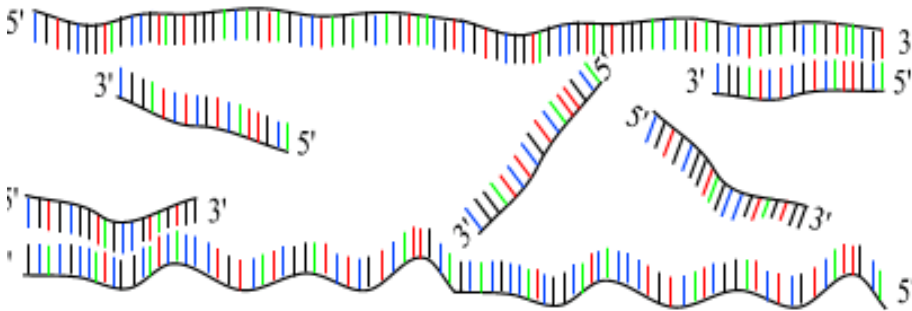
Durante o alongamento, a DNA polimerase cria a cadeia de DNA complementar à medida que percorre o DNA de cadeia simples, incorporando desoxirribonucleótidos presentes na reação.

Após cada ciclo, a quantidade de DNA duplica. Assim, após múltiplos ciclos, o aumento da quantidade de DNA é exponencial de base 2.

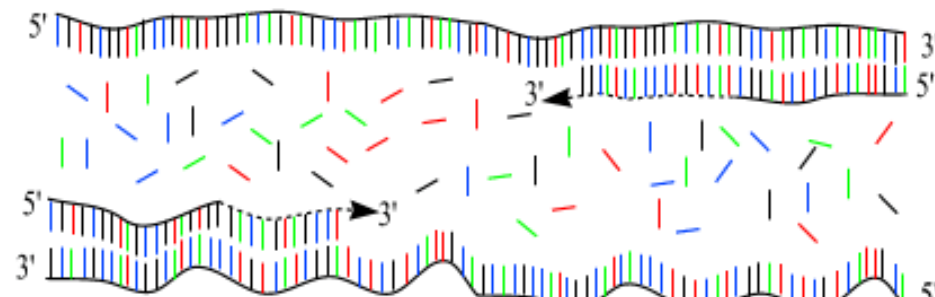
Etapas da PCR



Step 1 – desnaturação
1 minuto – 94°C



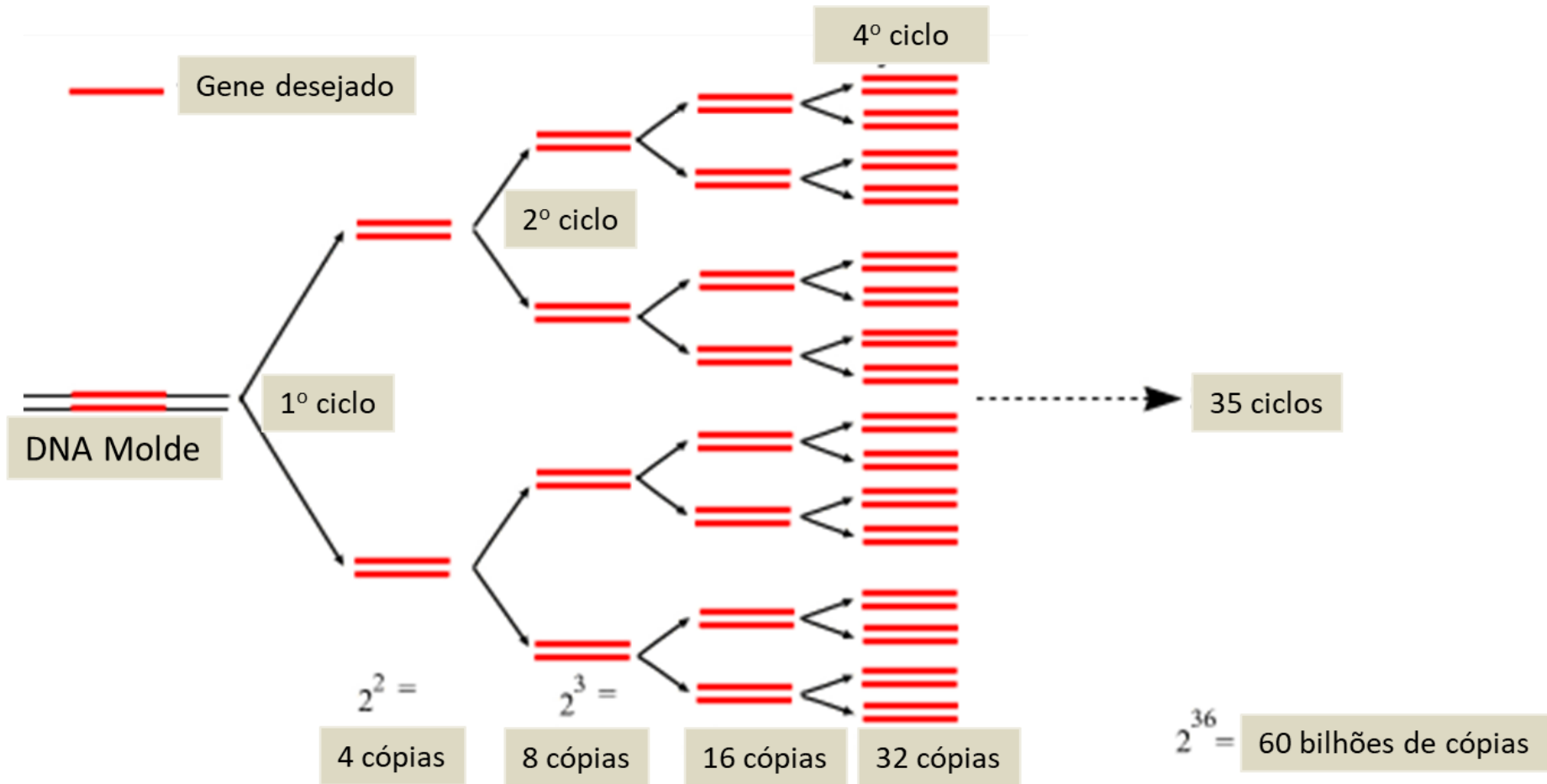
Step 2 – anelamento
45 segundos – 55°C



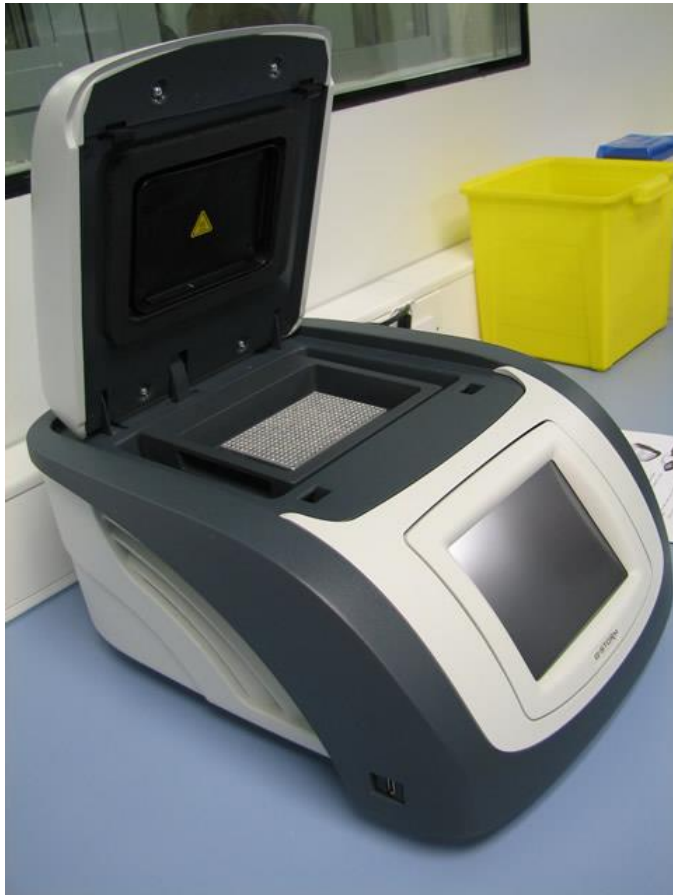
Step 3 – extensão
45 segundos – 72°C

**De 30 – 40
ciclos de três
etapas**

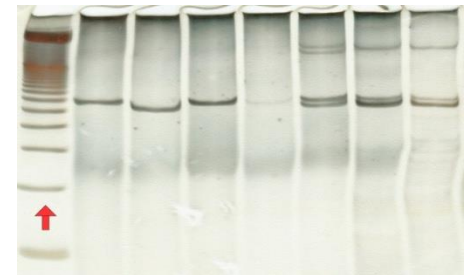
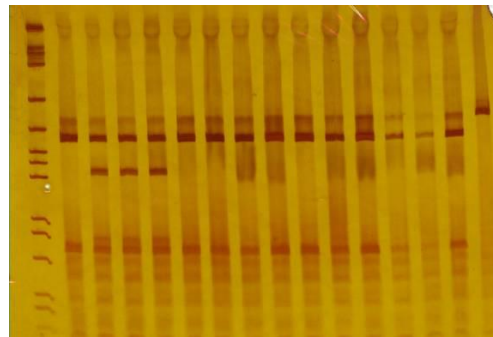
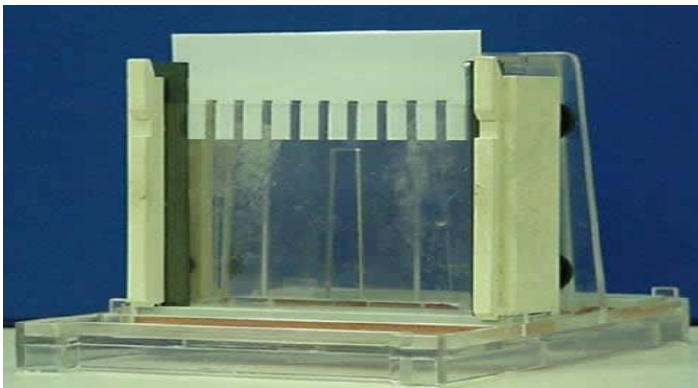
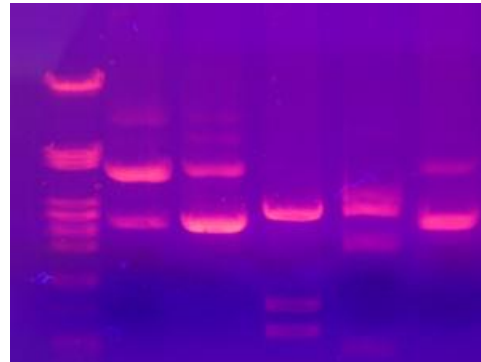
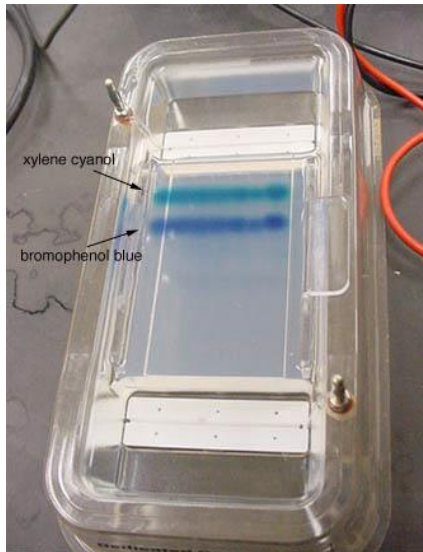
A AMPLIFICAÇÃO É EXPONENCIAL!!



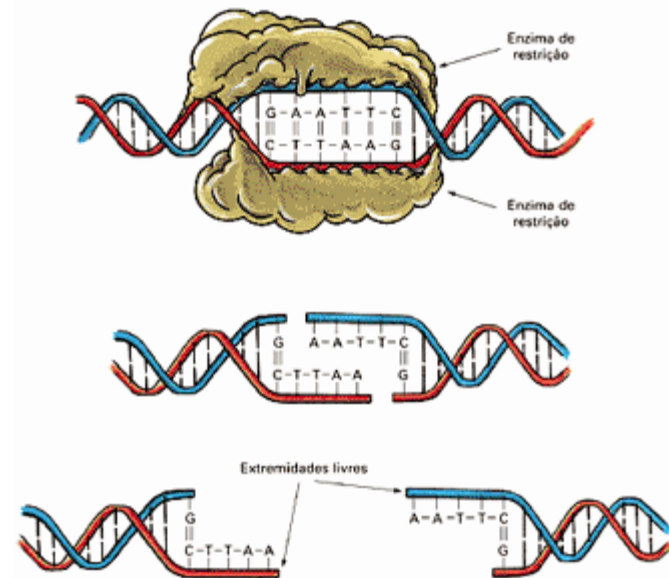
TERMOCICLADOR



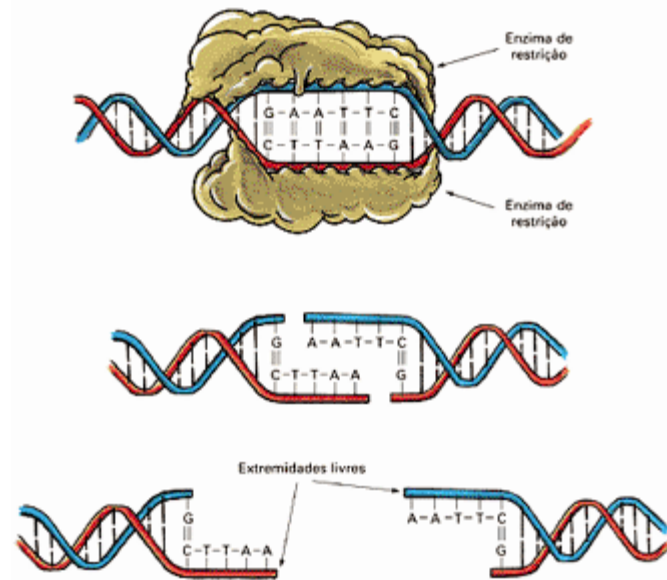
VISUALIZANDO O MATERIAL AMPLIFICADO



APLICAÇÃO DE DIFERENTES FERRAMENTAS EM ESTUDOS MOLECULARES



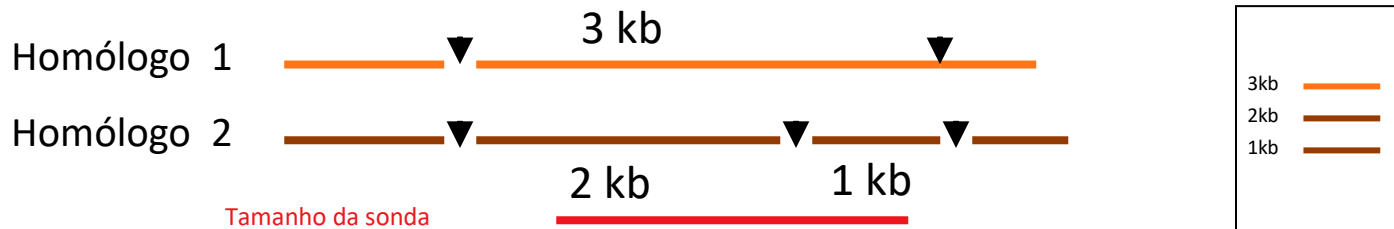
APLICAÇÃO DE DIFERENTES FERRAMENTAS EM ESTUDOS MOLECULARES



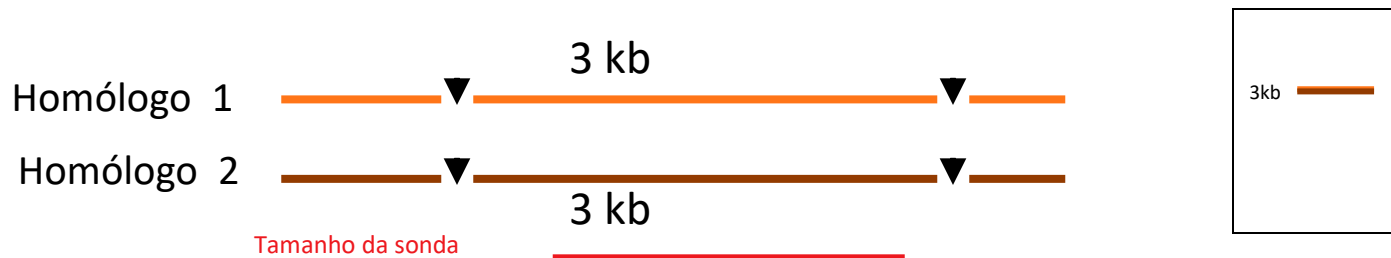
PCR-RFLP - (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

- Marcador de DNA
- Mutações em 2 alelos específicos de cada indivíduo em locais de restrição – polimorfismo:
 - sequências diferentes de restrição
 - diferentes tamanhos de fragmentos
- Muitas doenças humanas prejudiciais ou fatais caem nesta categoria

Indivíduo 1

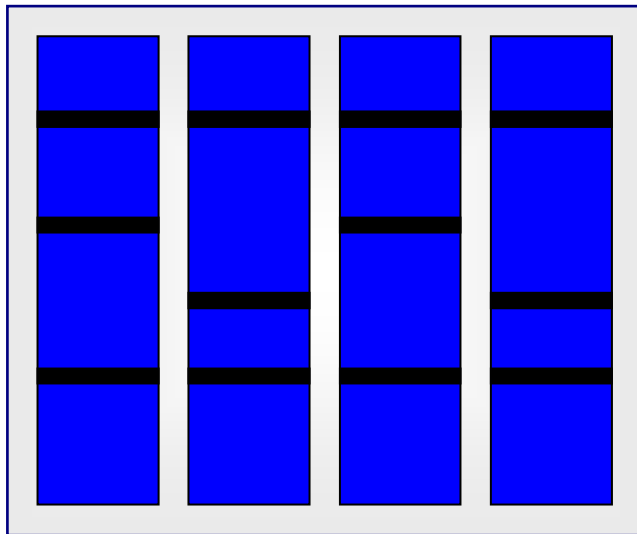


Indivíduo 2

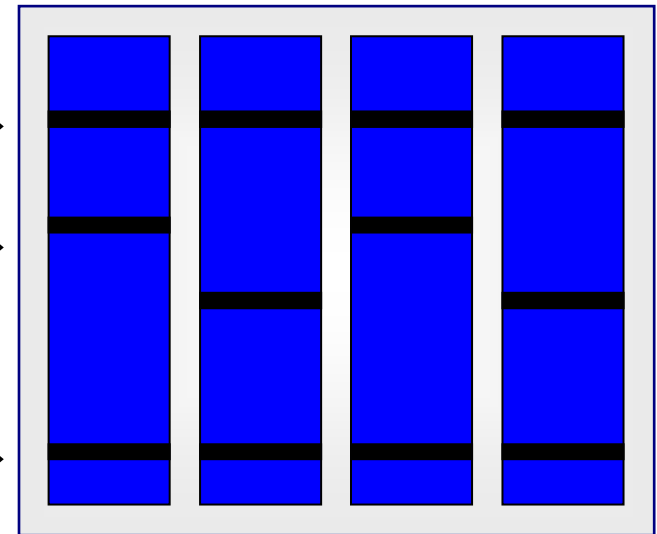


‘Várias formas desta região constituem um RFLP’

Testes padrões do DNA das
pessoas com doença



Testes padrões do DNA de
pessoas saudáveis (controle)



← Banda igual →
← Banda igual →
← Banda comum em
pessoas com doença →
← Banda comum em
pessoas saudáveis →

A existência de RFLPs fornece a base para estabelecer relacionamentos inequívocos de paternidade

ESTUDO DIRIGIDO

1. Princípio da Tecnologia do DNA recombinante
2. Enzimas de restrição
3. Vetores de Clonagem
4. Transformação bacteriana
5. Seleção de uma bactéria transformada?
6. Eletroforese
7. PCR;
8. Aplicação da técnica de PCR;

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.**

