

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP
Disciplina: LGN0232-1 Genética Molecular

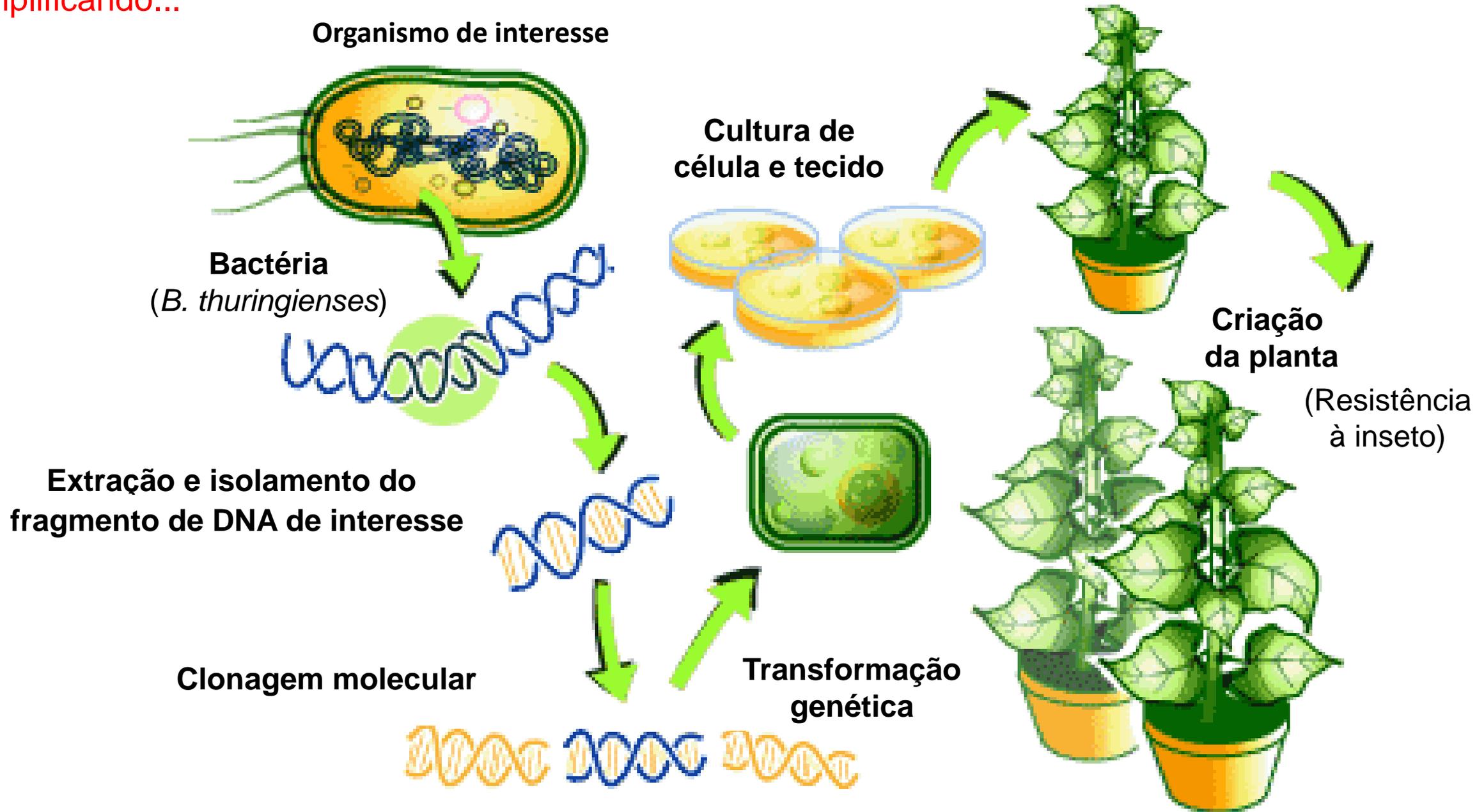


AULA PRÁTICA

Enzimas de restrição, PCR e eletroforese

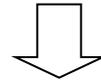
Piracicaba
Outubro de 2023

Exemplificando...

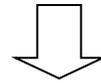


COMO FAZER UM DNA RECOMBINANTE?

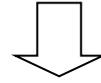
Organismo de interesse



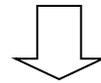
Extração do DNA total



Clivagem do DNA genômico ou PCR



Clonagem dos fragmentos em vetores



Armazenamento dos vetores em hospedeiros

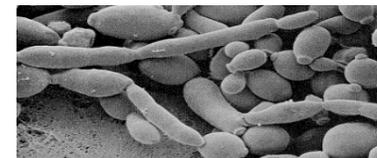
FERRAMENTAS UTILIZADAS NA TDR

Enzimas: enzimas de restrição
DNA ligase

Vetores: plasmídios
fagos (vírus de bactérias)
cosmídeos
cromossomos artificiais



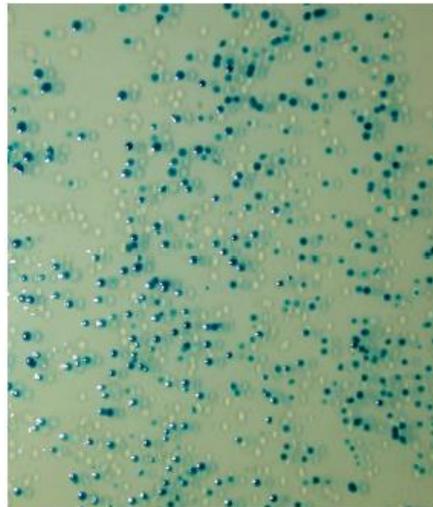
Hospedeiros: *E. coli*
levedura
células animais
células vegetais



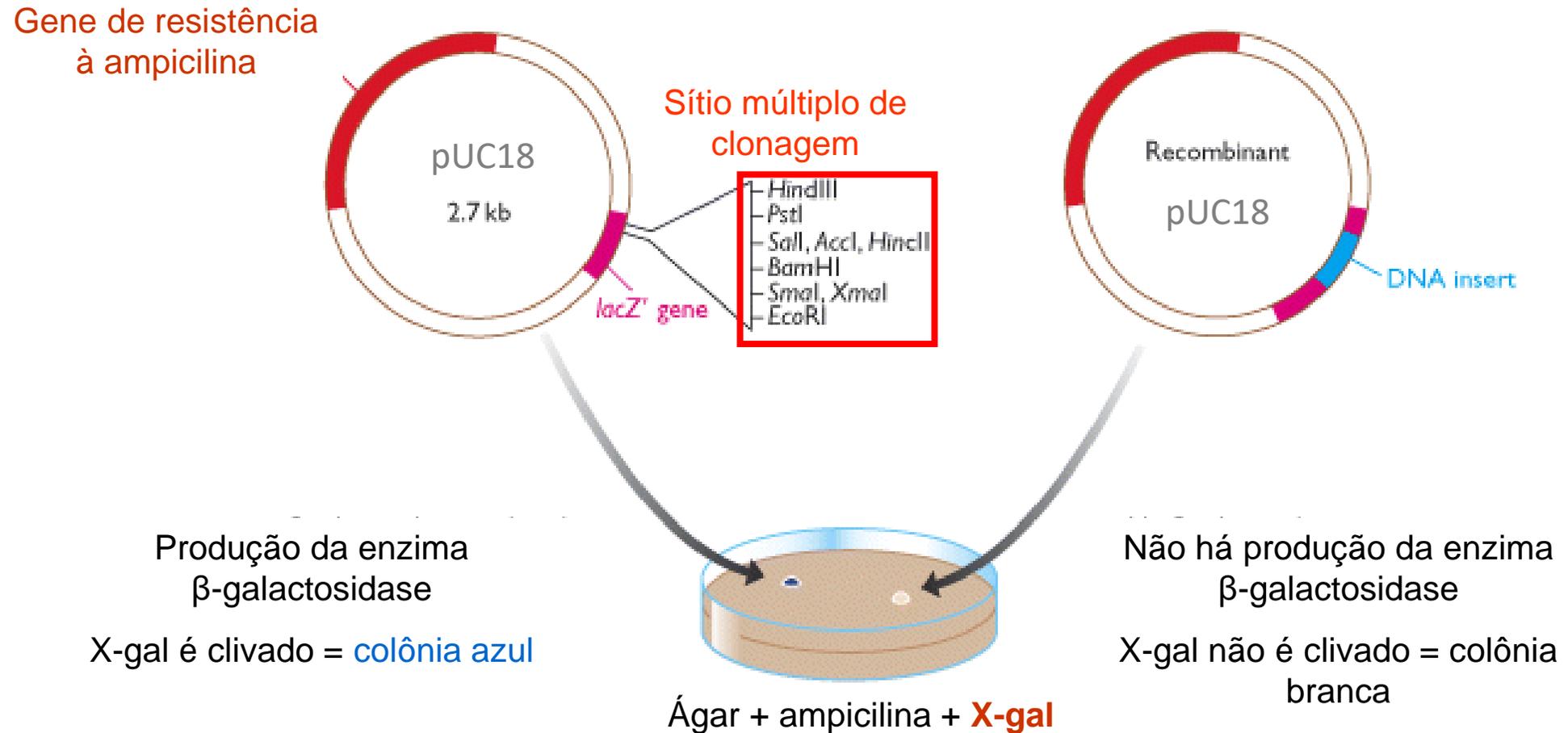
Relembrando...



Quais colônias nos interessam e por quê?



SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES



Gene *lacZ* = codifica a enzima β -galactosidase

Gene *cry*

Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga

Tabela 1. Vegetais modificados com genes *cry* de *B. thuringiensis*, resistentes a insetos-praga de importância agrícola (adaptado de Fontes *et al.*, 2002).

Table 1. Insect-resistant crops modified with *cry* genes from *B. thuringiensis* (adapted from Fontes *et al.*, 2002).

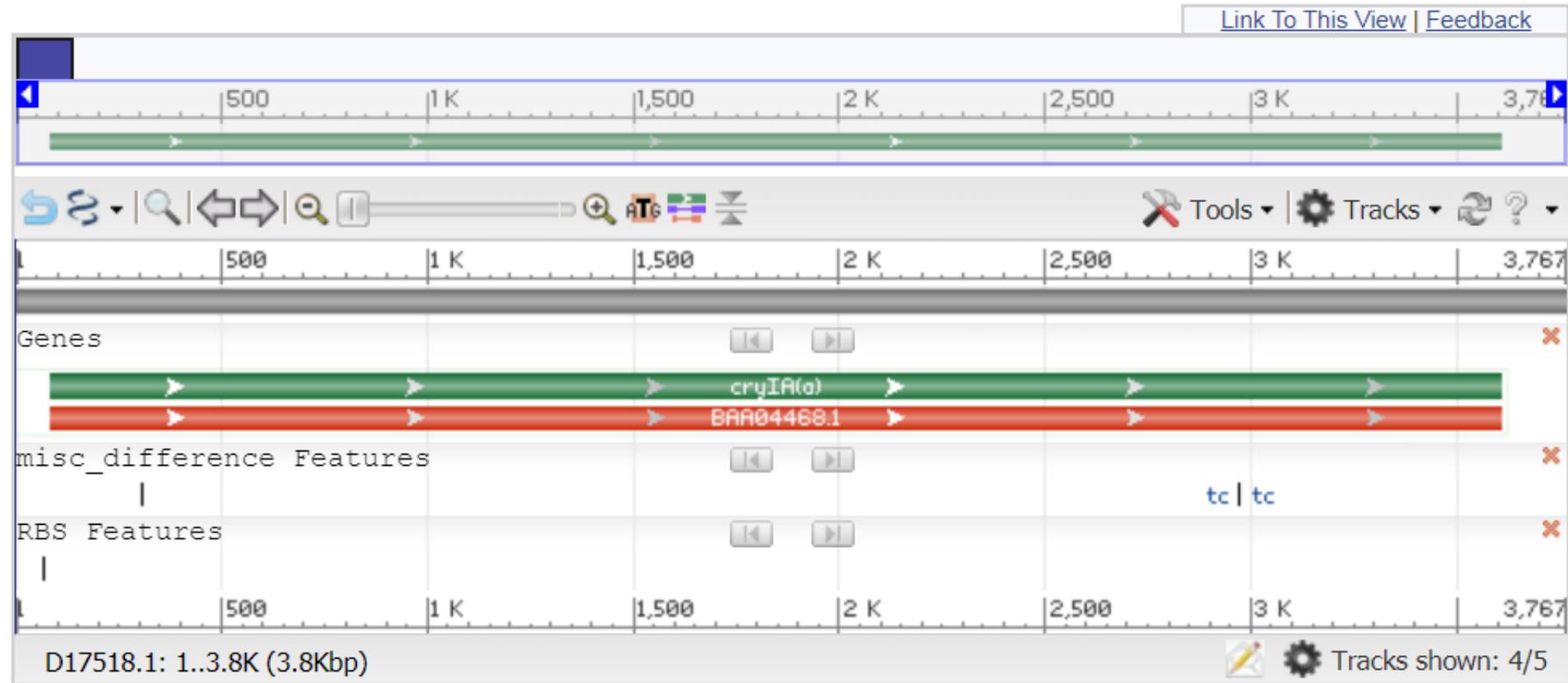
| Planta | Gene <i>cry</i> | Inseto-alvo | Referência |
|-----------|-------------------------------|---|--|
| Álamo | <i>cry1Aa</i> | <i>Lymantria dispar</i> (L.) (Lep.) | McCown <i>et al.</i> (1991) |
| | <i>cry3Aa</i> | <i>Chrysomela tremulae</i> F. (Col.) | Cornu <i>et al.</i> (1996) |
| Alfafa | <i>cry1Ca</i> | <i>Spodoptera littoralis</i> (Boiusduval) (Lep.) | Sthrizhov <i>et al.</i> (1996) |
| Algodão | <i>cry1Ab</i> | <i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> | Perlak <i>et al.</i> (1990) |
| | <i>cry1Ac</i> e <i>cry2Ab</i> | <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> (Walker) (Lep.) | Adamczyk <i>et al.</i> (2001) |
| Batata | <i>cry1Ab</i> | <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) (Lep.) | Peferoen <i>et al.</i> (1992), Rico <i>et al.</i> (1998) |
| | <i>cry1Ab</i> | <i>Heliothis armigera</i> (Hübner) | Chakrabarti <i>et al.</i> (2000) |
| | <i>cry3Aa</i> | <i>Leptinotarsa decemlineata</i> | Adang <i>et al.</i> (1993), Perlak <i>et al.</i> (1993), Coombs <i>et al.</i> (2002) |
| Berinjela | <i>cry1Ab</i> | <i>Leucinodes orbonalis</i> Guenée (Lep.) | Kumar <i>et al.</i> (1998) |
| | <i>cry3A</i> | <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say) (Col.) | Jelenkovic <i>et al.</i> (1998) |
| Brócolis | <i>cry1C</i> | <i>Plutella xylostella</i> (L.) (Lep.) | Zhao <i>et al.</i> (2001) |
| Canola | <i>cry1Ac</i> | <i>Thrichoplusia ni</i> (Hübner) (Lep.), <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner), | Stewart <i>et al.</i> (1996b) |
| | <i>cry1Ac</i> | <i>Heliothis virescens</i> (Fabr.), | |

Neotropical Biology and Conservation
3(3):159-168, september - december 2008
© by Unisinos - doi: 10.4013/nbc.20083.07

Bacillus thuringiensis cryIA(a) gene for insecticidal crystal protein, complete cds

GenBank: D17518.1

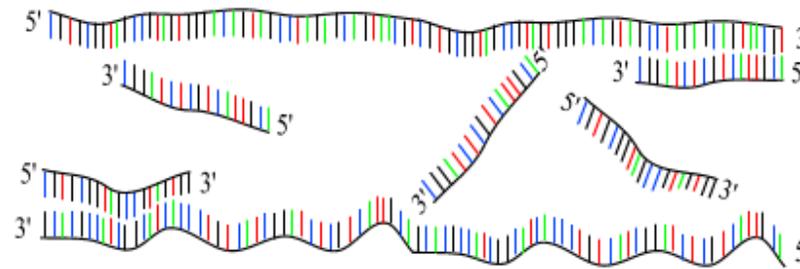
[GenBank](#) [FASTA](#)



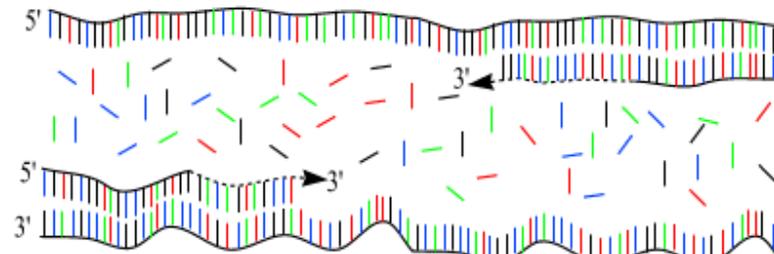
“POLYMERASE CHAIN REACTION” - PCR



Desnaturação
94°C



Anelamento
55°C

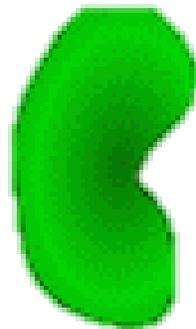


Extensão
72°C

REAÇÃO DA PCR



DNA molde



DNA polimerase

H₂O + tampão + Mg²⁺



Primers

A T C G

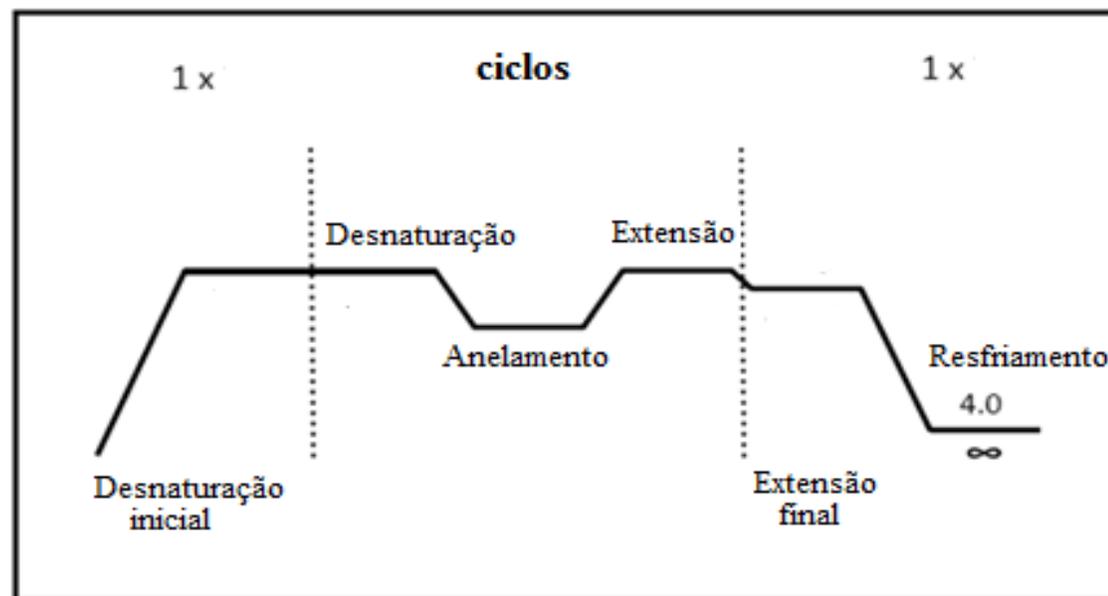
Nucleotídeos

REAÇÃO DA PCR

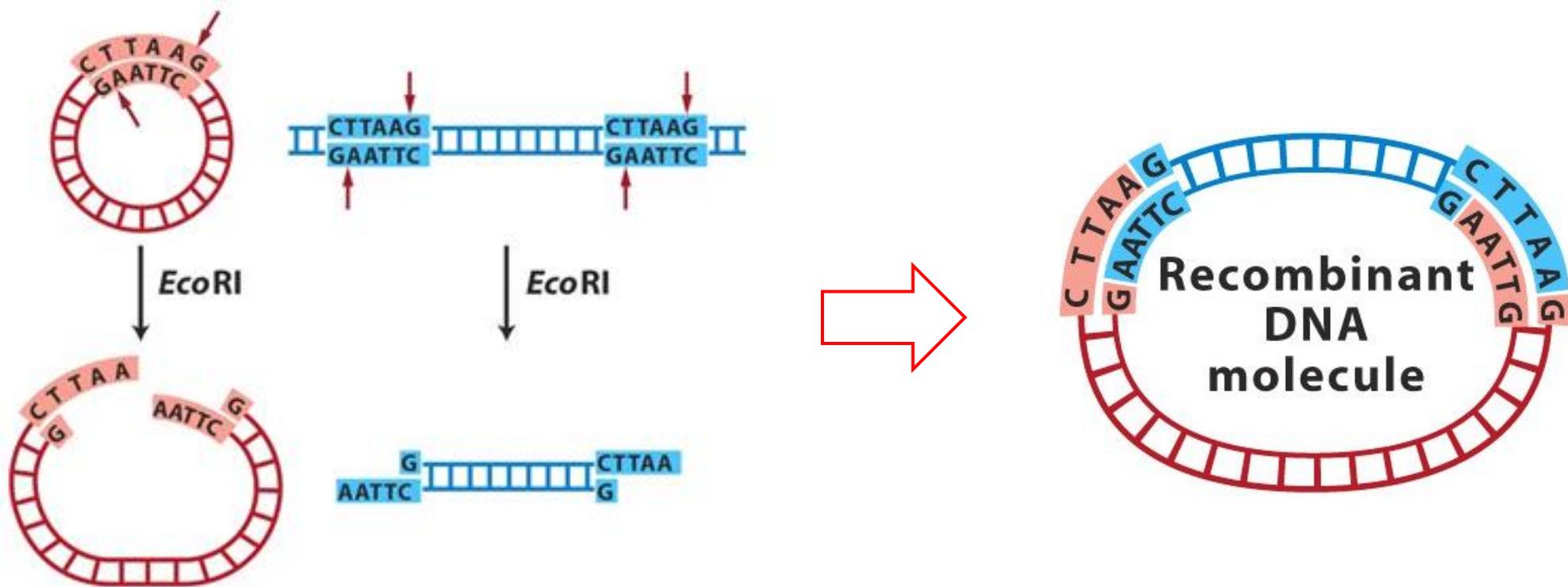


| Reagentes | 1 reação | 3 reações | Função |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Água <u>milli-Q</u> | 30,0 μL | 90,0 μL | Completar o volume da reação |
| Tampão/buffer | 5,0 μL | 15,0 μL | Mantém as condições ótimas para atuação da enzima. |
| MgCl ₂ | 4,0 μL | 12,0 μL | Fornecer os íons Mg^{+2} que são cofatores da DNA polimerase. |
| <u>Primer Forward</u> (PF) | 1,5 μL | 4,5 μL | Anelam-se ao DNA molde e fornecem uma extremidade 5' livre para a DNA polimerase iniciar a síntese da nova fita (det. seq. que será amplificada) |
| <u>Primer Reverse</u> (PR) | 1,5 μL | 4,5 μL | |
| <u>DNTPs</u> | 2,0 μL | 6,0 μL | Substrato para a reação de síntese (contém quant. <u>equimolares</u> de A, T, C, G). |
| <u>Tag</u> DNA polimerase | 1,0 μL | 3,0 μL | Enzima termoestável que catalisa a extensão dos <i>primers</i> anelados. |
| <u>Volume total do mix</u> | 45,0 μL | 135,0 μL | |
| DNA*** | 5 μL | | É o DNA molde para a reação, contém o fragmento que se quer amplificar. |

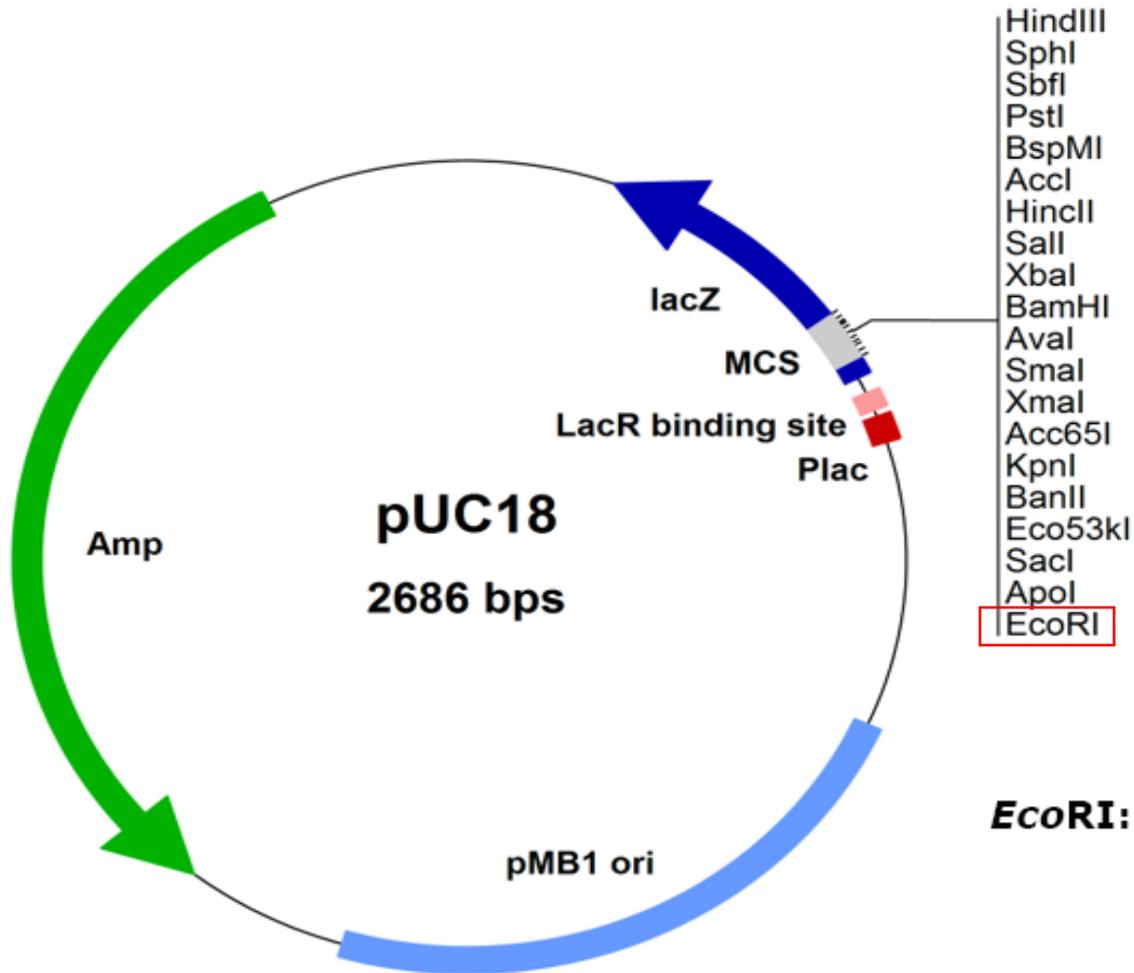
PCR - Termociclador



DIGESTÃO – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



DIGESTÃO – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

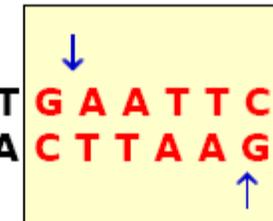


Produção da enzima
 β -galactosidase

X-gal é clivado = **colônia azul**

EcoRI:

5' ... TAGACT **G A A T T C** AAGTC ... 3'
3' ... ATCTGA **C T T A A G** TTCAG ... 5'



DIGESTÃO – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

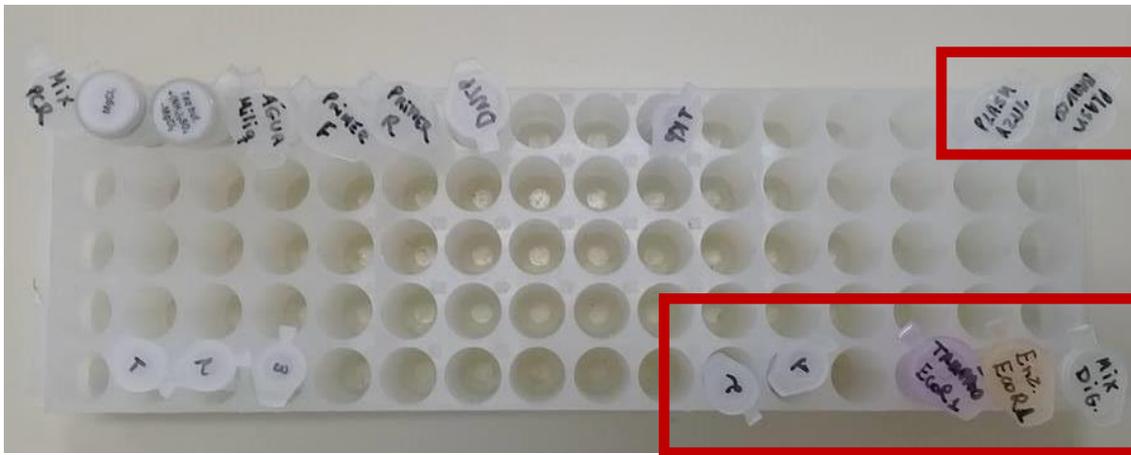
1. DNA MOLDE : plasmídeo / DNA genômico

2. Enzima

**INCUBAÇÃO EM BANHO MARIA
(37°C por 12h)**

3. Tampão

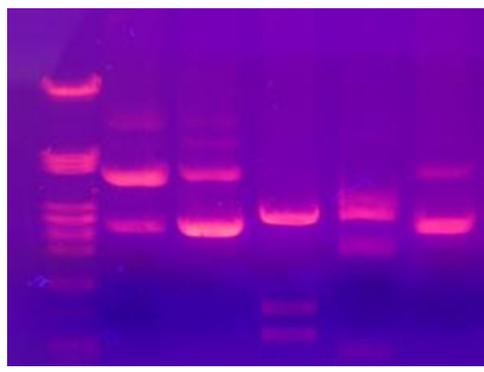
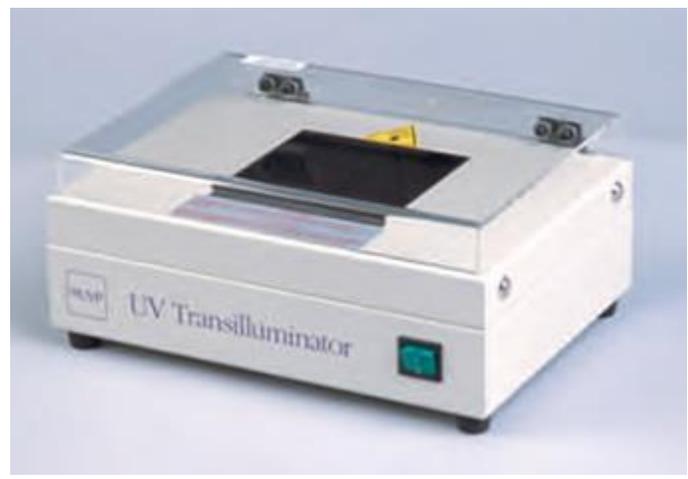
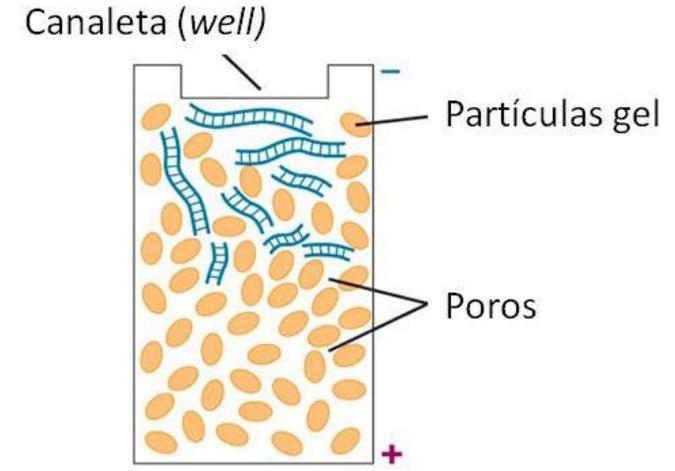
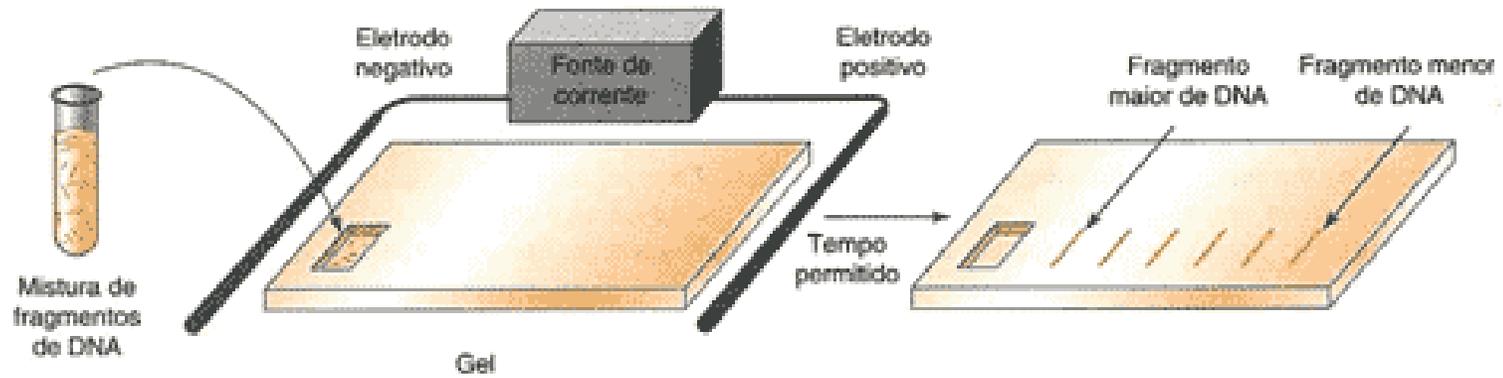
4. Água



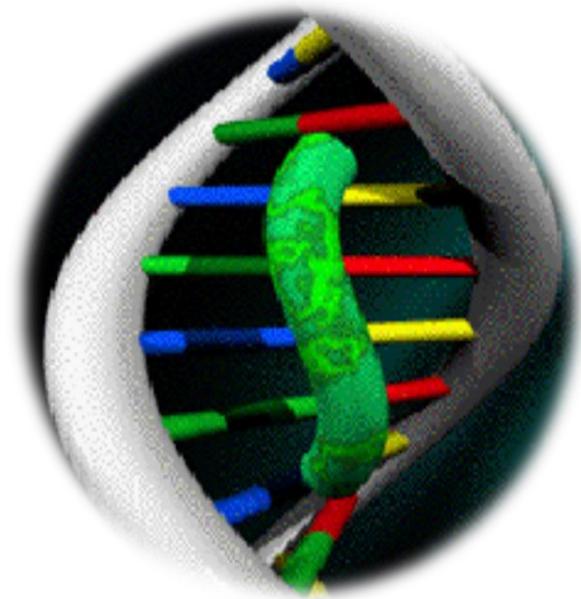
| Reagentes | 1 reação | 2 reações |
|---|---------------|----------------|
| Tampão de reação com cofatores | 1,0 µL | 2,0 µL |
| Enzima de restrição <i>EcoRI</i> | 1,0 µL | 2,0 µL |
| Água <u>mili-Q esterelizada</u> | 6,0 µL | 12,0 µL |
| Volume final do mix | 8,0 µL | 16,0 µL |
| Plasmídeo <i>pUC18</i> – colônia <i>branca</i> | 2,0 µL | |
| Plasmídeo <i>pUC18</i> – colônia <i>azul</i> | 2,0 µL | |

Observação: Trocar de ponteira ao pegar cada reagente para evitar contaminação.

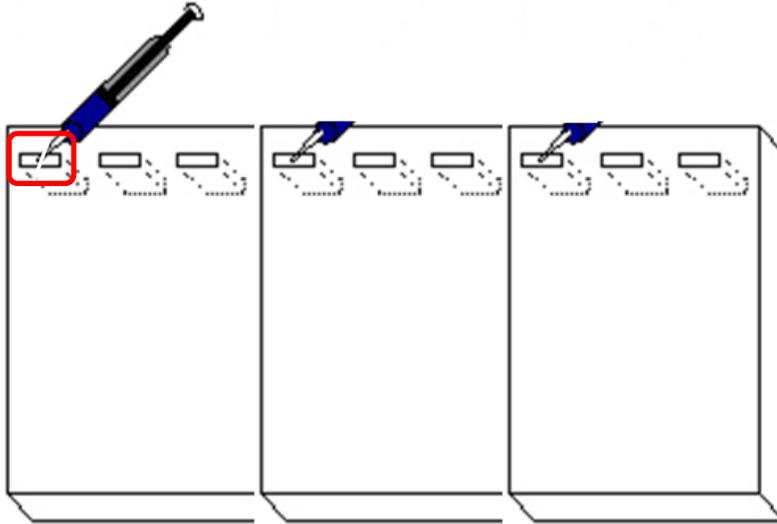
ELETROFORESE



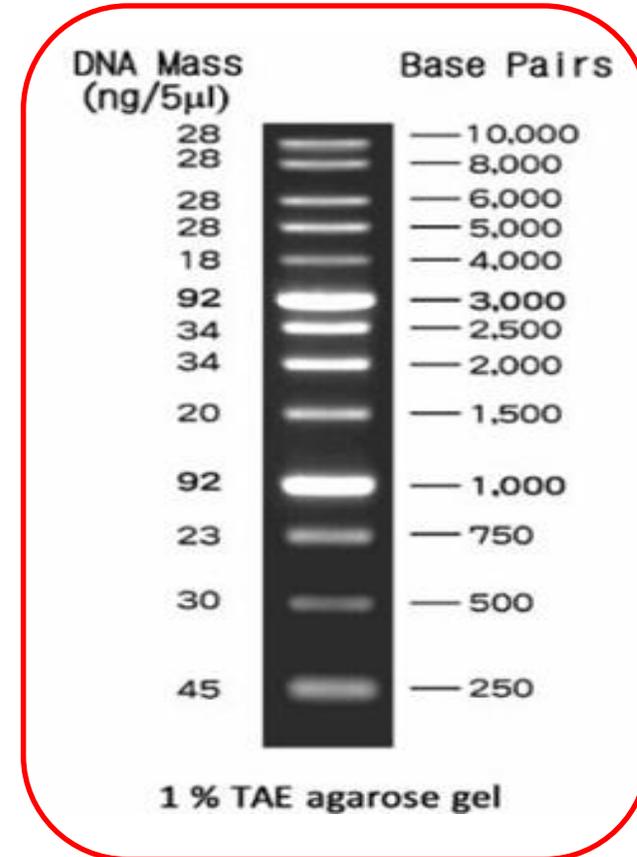
ELETRÓFORESE



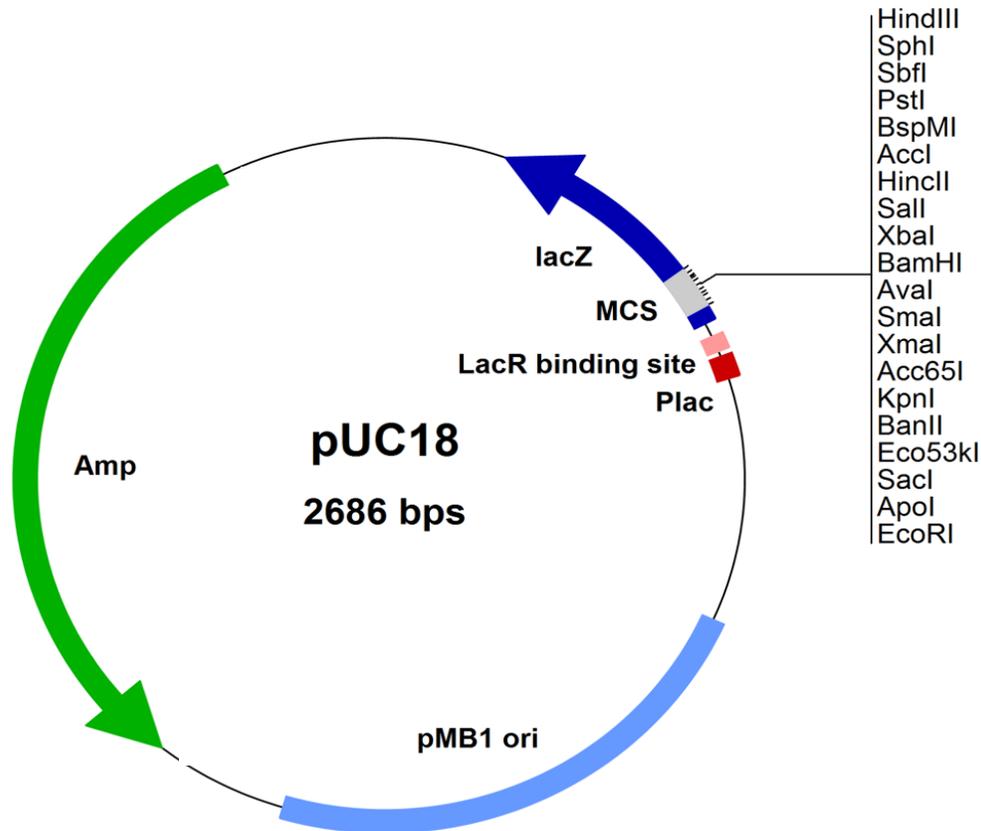
ELETROFORESE



| Pocinho do gel | Amostra |
|----------------|-----------------------|
| 1 | Marcador 1Kb |
| 2 | Plasmídeo integro |
| 3 | Plasmídeo digerido |
| 4 | PCR controle |
| 5 | PCR inserto |
| 6 | DNA genômico |
| 7 | DNA genômico digerido |



RELATÓRIO DA AULA PRÁTICA



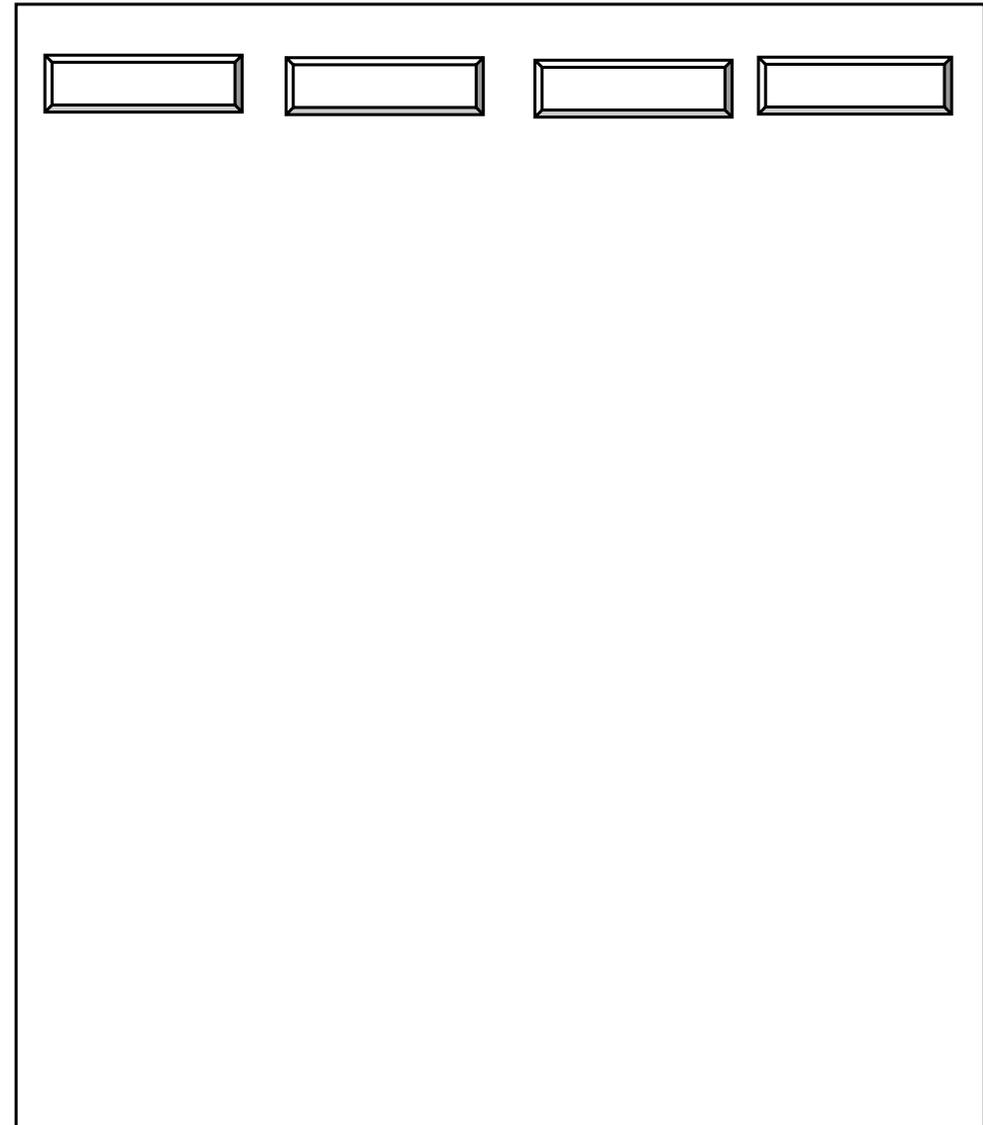
1. Encontre no plasmídeo puC 18 as três características essenciais que um vetor deve ter. Descreva a importância de cada uma delas.
2. Explique o sistema LacZ no plasmídeo pUC18 que garante que colônias azuis não contêm o inserto desejado.

3. Esquematize o resultado da PCR utilizando como DNA molde:

- 1 – Marcador molecular
- 2 - Plasmídeo proveniente de colônia azul
- 3 - Plasmídeo proveniente de colônia branca
- 4. – Controle

Obs: indique o tamanho das bandas obtidas

4. Qual a importância de usar um controle negativo na reação de PCR?



The diagram shows a rectangular gel electrophoresis apparatus. At the top, there are four rectangular wells, each representing a lane for a different PCR sample. The wells are arranged horizontally and are currently empty, intended for the user to draw the results of the PCR reaction, including the size of the bands.

5. A partir da sequência do gene *cry* abaixo, proponha um Primer Forward (PF) e um Primer Reverse (PR), ambos com aproximadamente 15 bases. 5.. Indique a direção 5' – 3'de cada um deles. Lembrando a sequência abaixo está na direção 5' – 3'.

```
1  tatgttttaa  attgtagtaa  tgaaaaacag  tattatatca  taatgaattg  gtatccta  
61  aaaagagatg  gaggtaactt  atggataaca  atccgaacat  caatgaatgc  attccttata  
121 attgtttaag  taaccctgaa  gtagaagtat  taggtggaga  aagaatagaa  actggttaca  
181 cccaatcga  ttttccttg  tcgctaacgc  aatttctttt  gagtgaattt  gttcccggg  
241 ctggatttgt  gttaggacta  gttgatataa  tatggggaat  ttttgggtccc  tctcaatggg
```

...

```
3541 ggattgagat  tggagaaacg  gaaggaacat  ttatcgtgga  cagcgtggaa  ttactcctta  
3601 tggaggaata  gtctcatgca  aactcagggt  taaatatcgt  tttcaaataca  attgtccaag  
3661 agcagcatta  caaatagata  agtaatttgt  tgtaatgaaa  aacggacatc  acctccattg  
3721 aaacggagtg  atgtccgttt  tactatgtta  ttttctagta  atacata
```

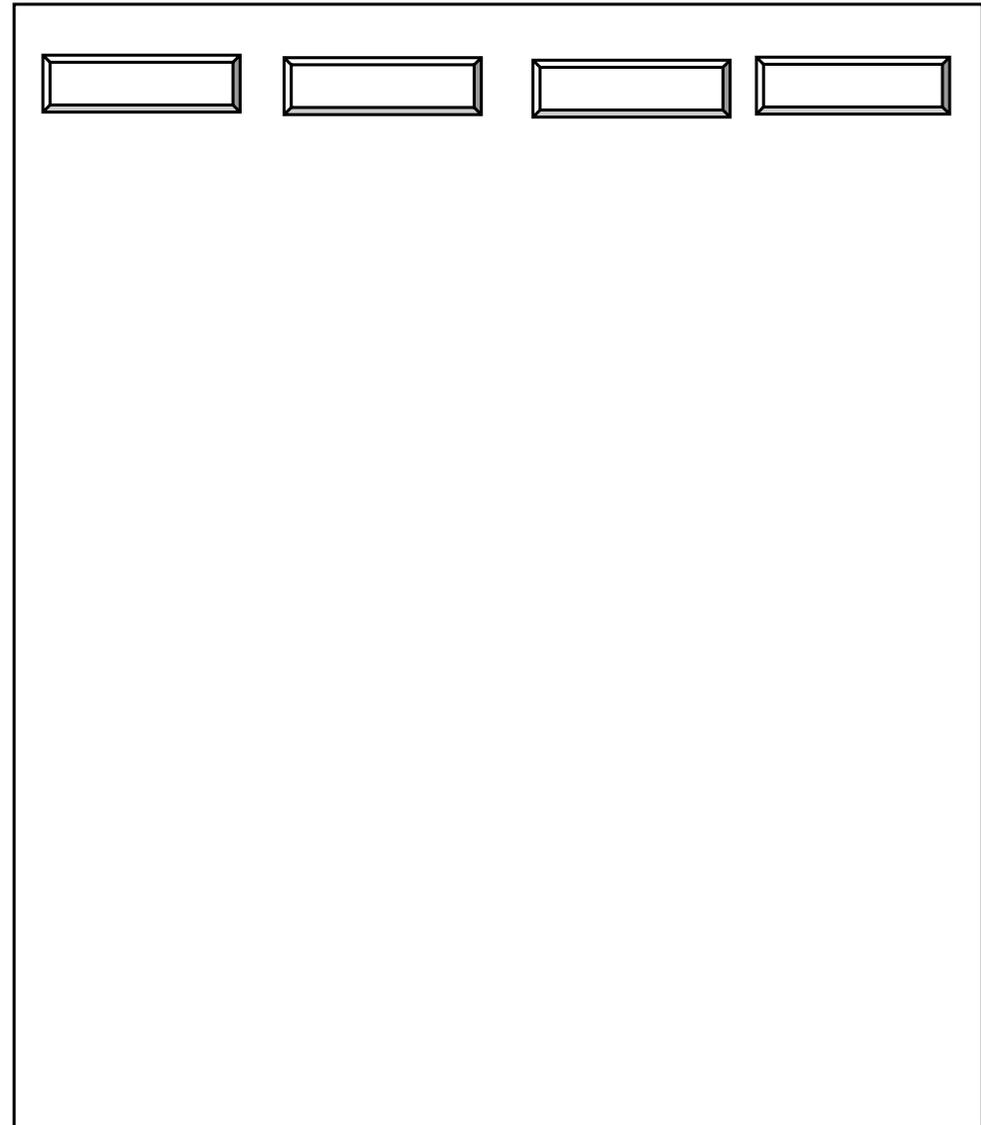
6. Esquematize o resultado da digestão de DNA utilizando os DNA's abaixo:

1 – Marcador molecular

2 - Plasmídeo proveniente de colônia azul

3 - Plasmídeo proveniente de colônia branca

4. – DNA da bactéria BT



The diagram shows a large rectangular area for drawing the results of a DNA digestion. At the top of this area, there are four small, empty rectangular boxes, each with a double-line border, representing lanes in a gel electrophoresis experiment. The rest of the area is blank, intended for the student to draw the bands of DNA fragments.