

CCM121 Biologia Molecular

Técnicas de Biologia Molecular

Extração de DNA genômico

PCR

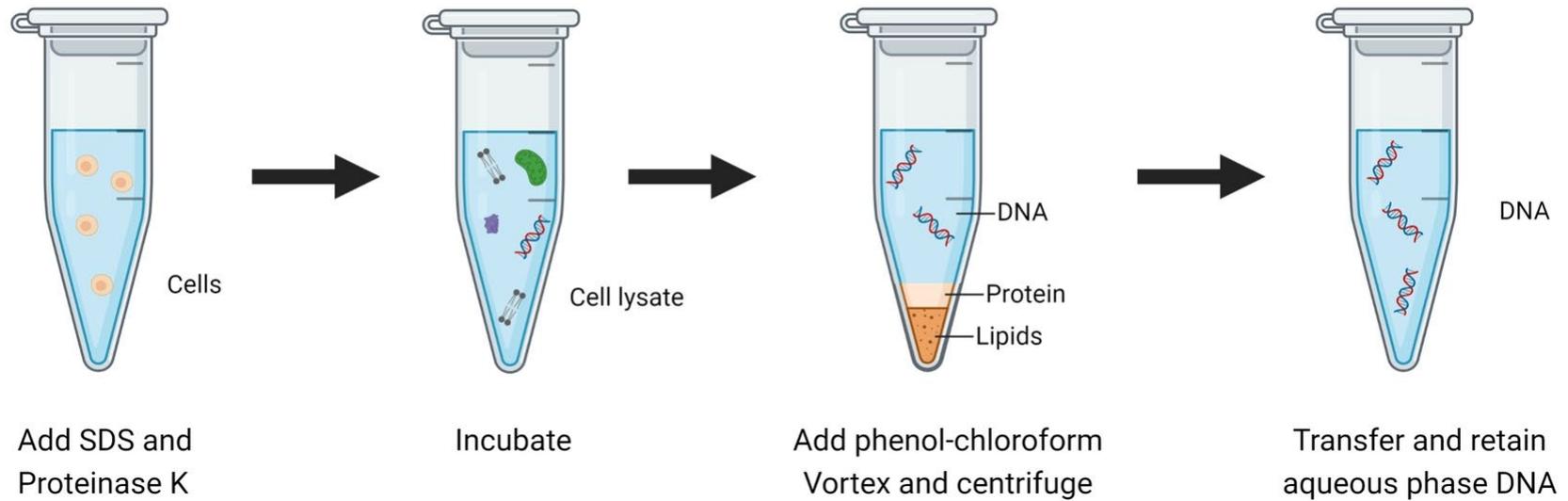
Enzimas de restrição

Plasmídeos

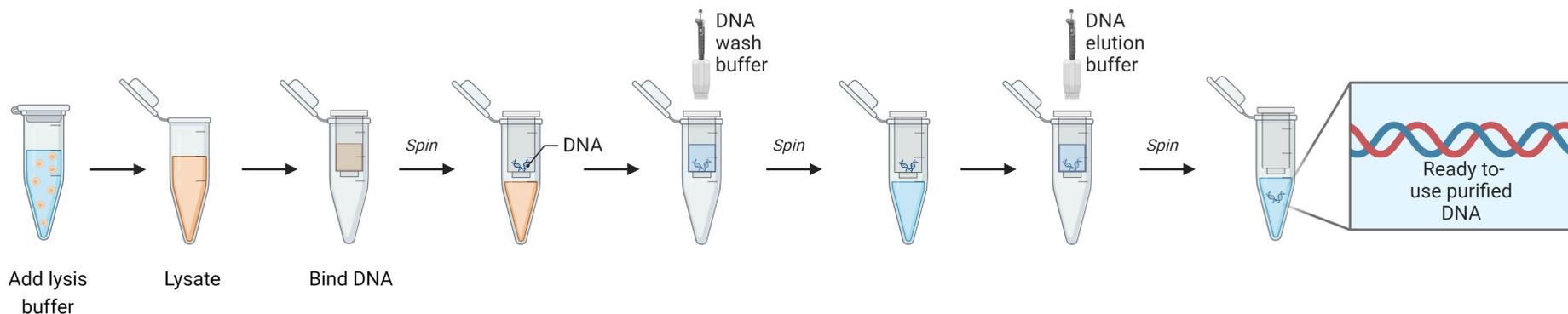
RFLP

Purificação de DNA genômico

Extração com fenol-clorofórmio



Extração com colunas de sílica

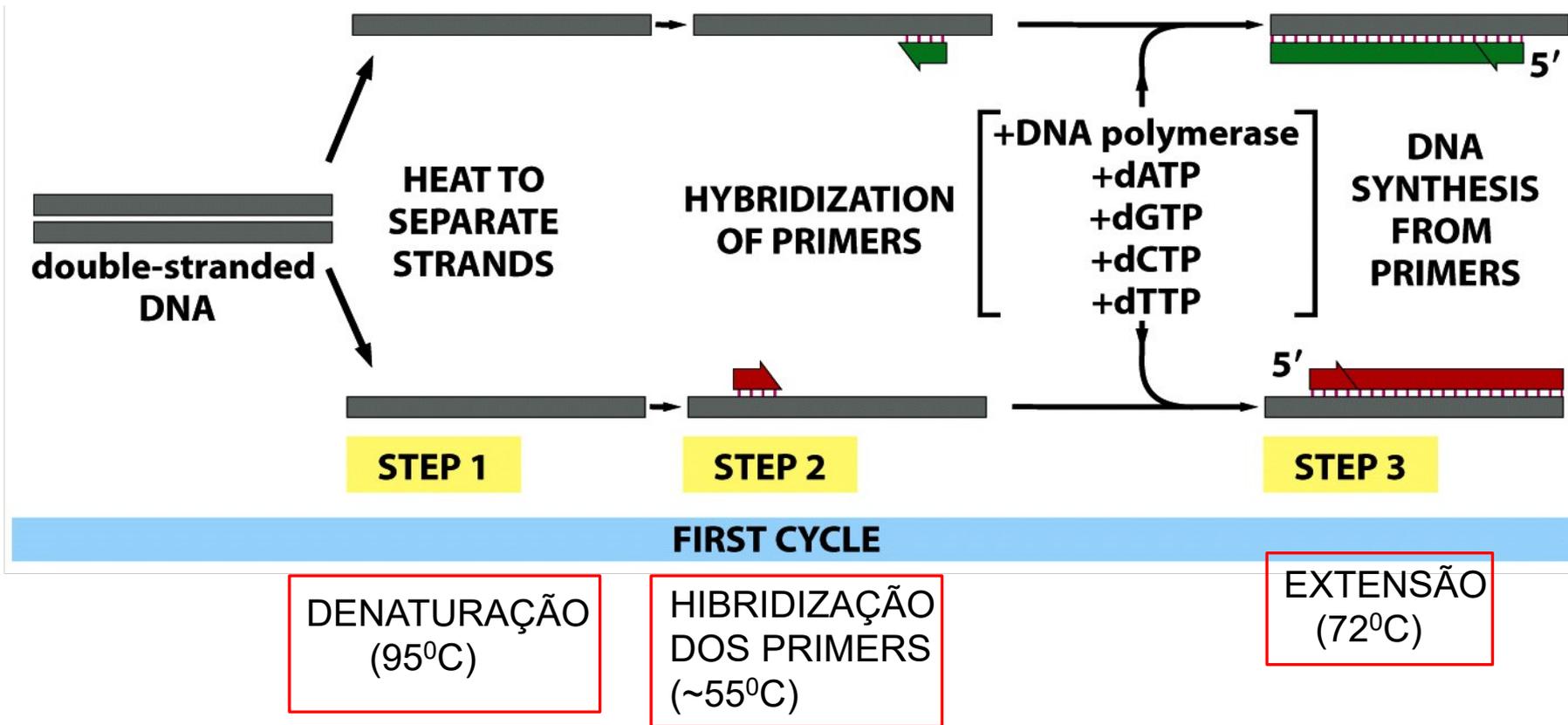


PCR (Polymerase Chain Reaction) (Reação em Cadeia da Polimerase)

- Técnica foi criada por Karry Mullis (1988).
- Prêmio Nobel em Química em 1993.
- Método para amplificação seletiva de sequências de DNA a partir de amostras contendo ácidos nucleicos (DNA ou RNA).
- A técnica explora as características da replicação do DNA.



Um ciclo de PCR e suas etapas



PCR ocorre em ciclos

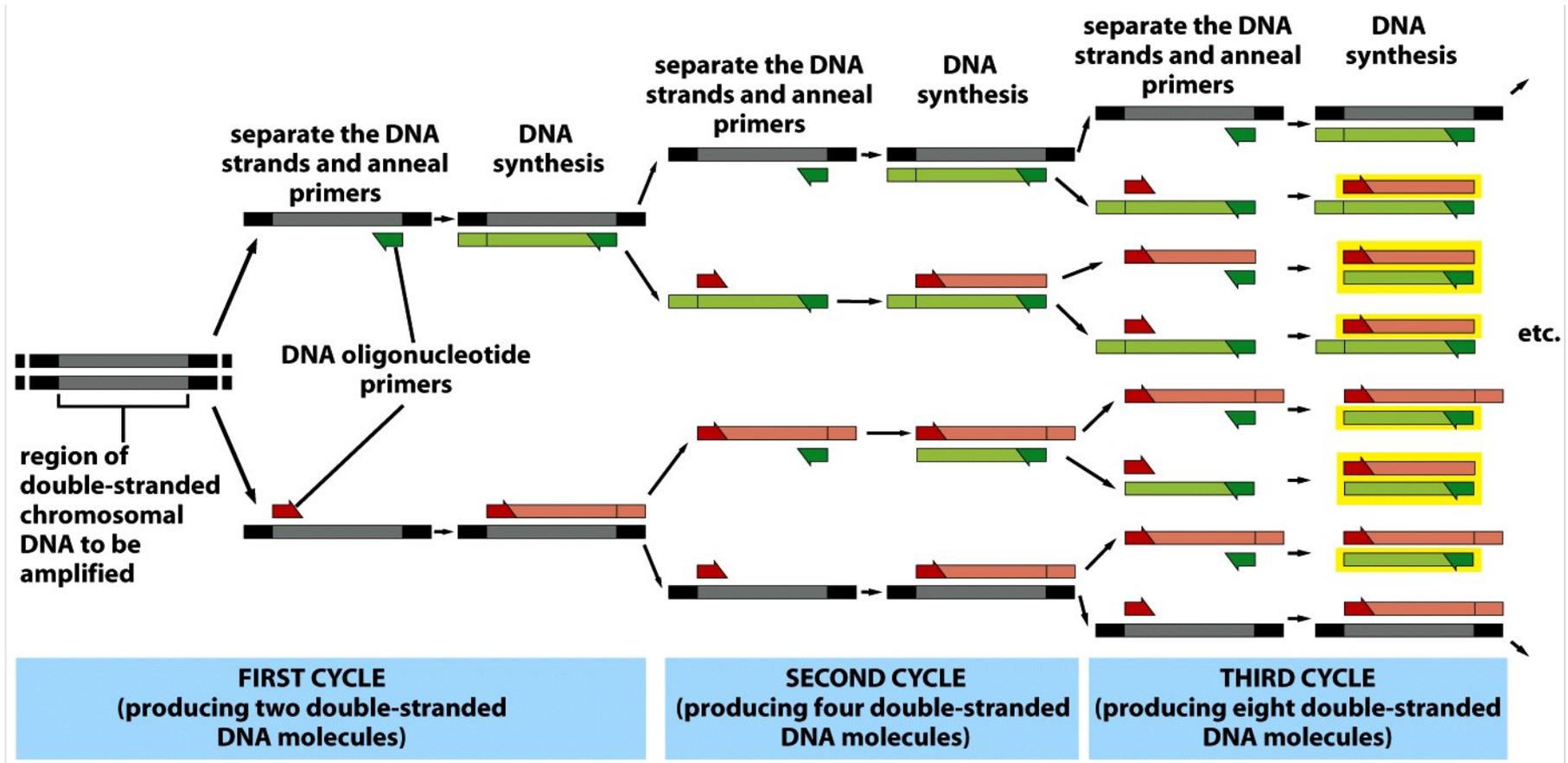


Figure 8-45b *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Qual a sequência dos primers (oligonucleotídeos) para amplificar o trecho indicado em azul da sequência de DNA abaixo?



5' GATTGTCTCTAGCACGTATTCGATGCCAGTGTGCAGTTTACGCGCTACGGA 3'
3' CTAACAGAGATCGTGCATAAGCTACGGTCACACGTCAAATGCGCGATGCCT 5'

5' GATTGTCTCTAGCACGTATTCGATGCCAGTGTGCAGTTTACGCGCTACGGA 3'
ATGCGCGAT 5'
← primer 2 (reverso)

primer 1 (forward)
→
5' TCTAGCACG

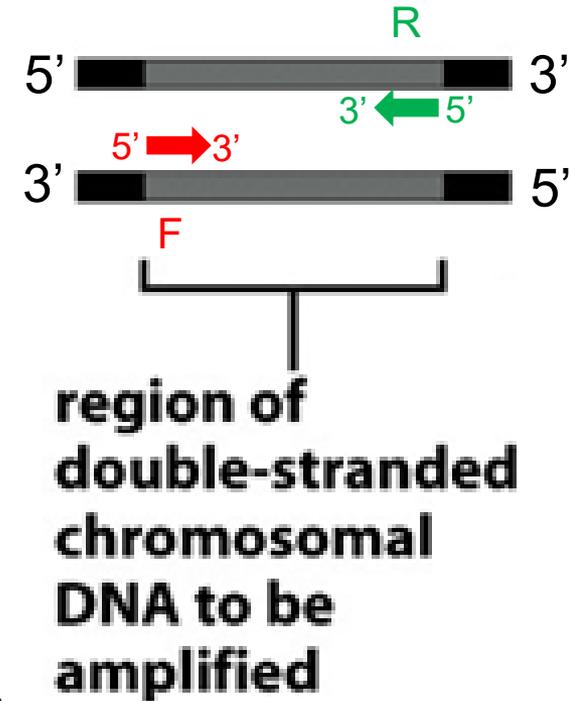
3' CTAACAGAGATCGTGCATAAGCTACGGTCACACGTCAAATGCGCGATGCCT 5'

*Na verdade em geral primers tem entre 18 e 24 nts de tamanho

Primers para PCR:

(primers = oligonucleotídeos = iniciadores)

- Um para cada fita do DNA
- Sequências específicas e conhecidas
- 18-24 bases complementares ao alvo
- Não devem formar estruturas secundárias
- Tm semelhante entre o primer F e primer R



Primer F= primer forward
Primer R= primer reverse

Taq DNA polimerase

DNA polimerase termicamente estável da bactéria *Thermus aquaticus* isolada de fontes termais do Parque Yellowstone (EUA) pelo microbiologista Thomas Brock em 1966.



A DNA-polimerase utilizada na PCR deve resistir a variação de temperatura durante os ciclos para evitar que tenhamos que adicionar mais enzima a cada ciclo.

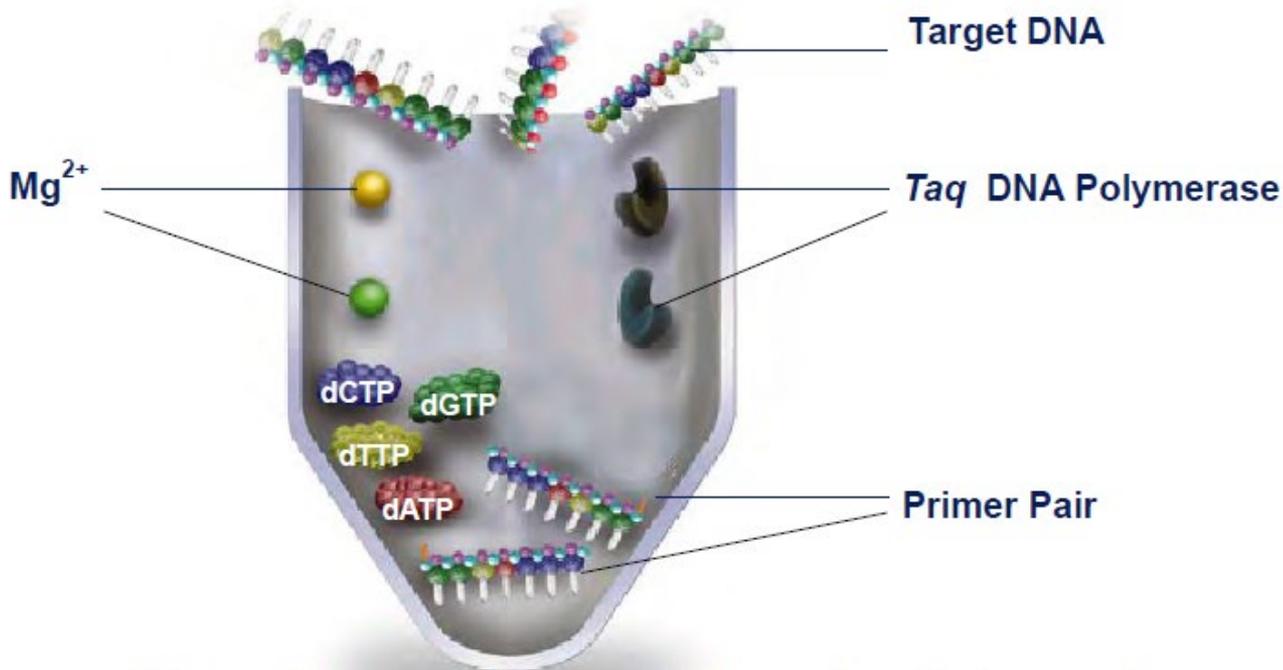
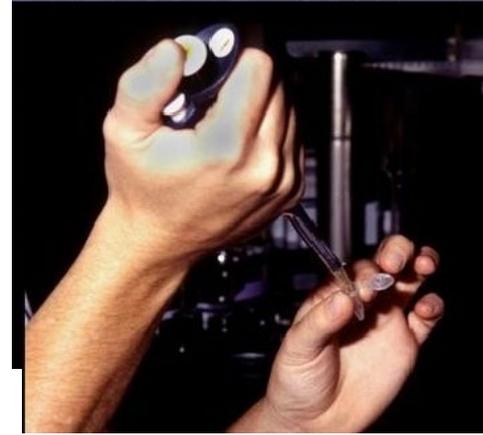
Temperatura ótima da *Taq* DNA polimerase: 72°C.

Taq DNA polimerase é estável na temperatura em que ocorre a denaturação (~95°C)

Não tem atividade revisora: 1-2 erros a cada 10⁴ bases

Atualmente, enzimas mais eficientes e com alta fidelidade estão disponíveis

Reagentes para a PCR são pipetados em microtubo



A amplificação se dá em ciclos de síntese da sequência alvo

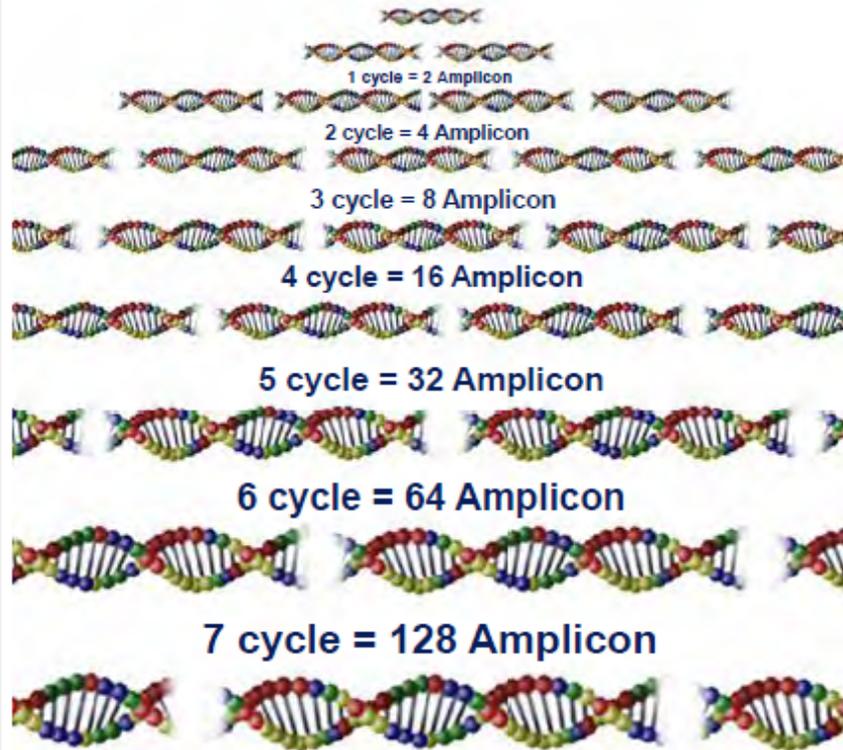
Termociclador



[https://dnlc.cshl.edu/resources/3d/
19-polymerase-chain-reaction.html](https://dnlc.cshl.edu/resources/3d/19-polymerase-chain-reaction.html)

[https://dnlc.cshl.edu/resources/ani
mations/pcr.html](https://dnlc.cshl.edu/resources/animations/pcr.html)

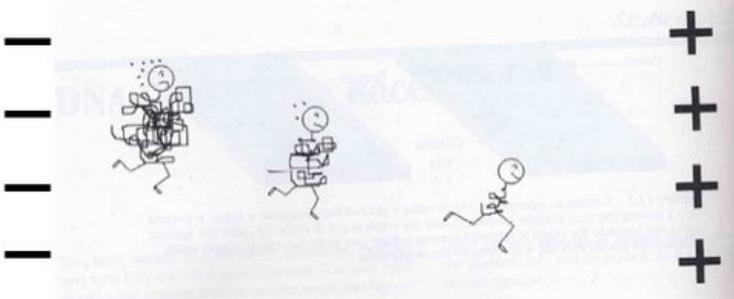
Amplificação do alvo



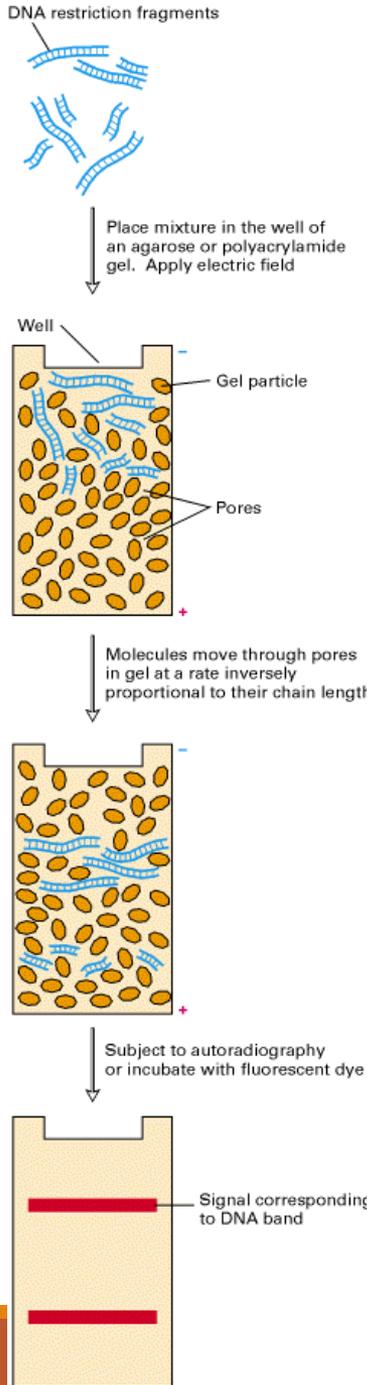
No. of Cycles	No. Amplicon Copies of Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

Eletroforese em gel de agarose

Moléculas maiores migram mais devagar que as menores, pois encontram mais resistência para passar pelos poros do gel.



O DNA (carga negativa) migra para o eletrodo positivo.



Brometo de etídeo

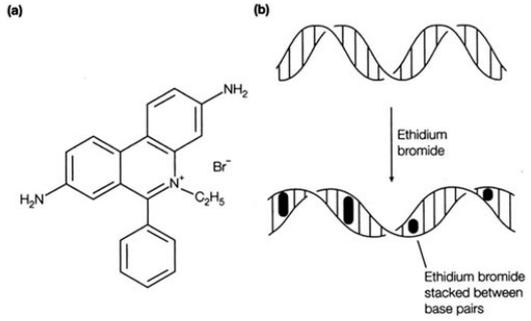
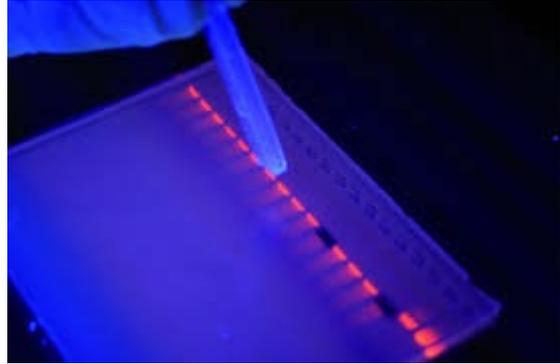
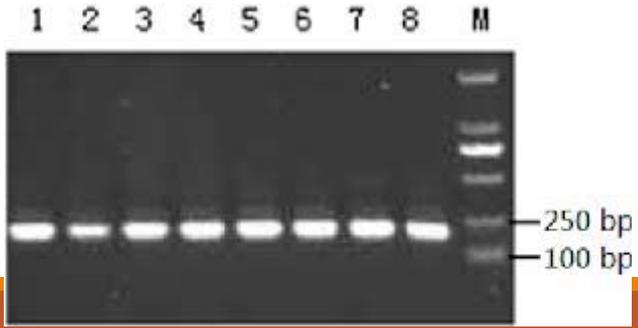


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



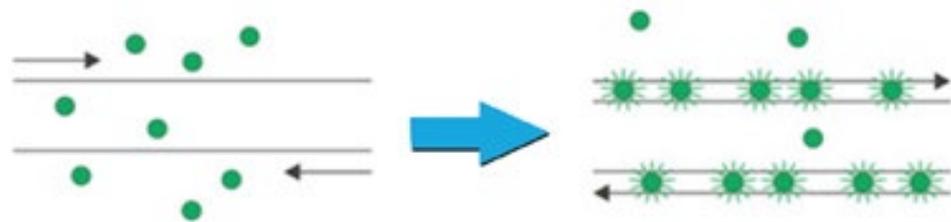
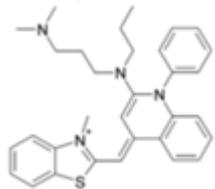
M=padrão de peso molecular



PCR em tempo real (Real time PCR) PCR quantitativa (qPCR)

Detecção dos produtos de PCR (amplicons) em tempo real com um corante fluorescente (ex: Sybr Green)

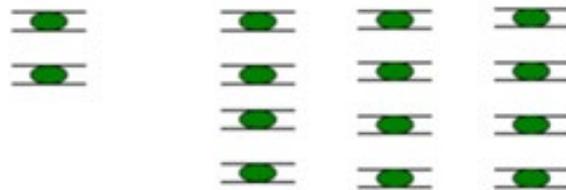
SYBR Green I é um *intercalante de DNA*, e só *fluoresce em dupla fita*.



1. Dye in solution emits low fluorescence

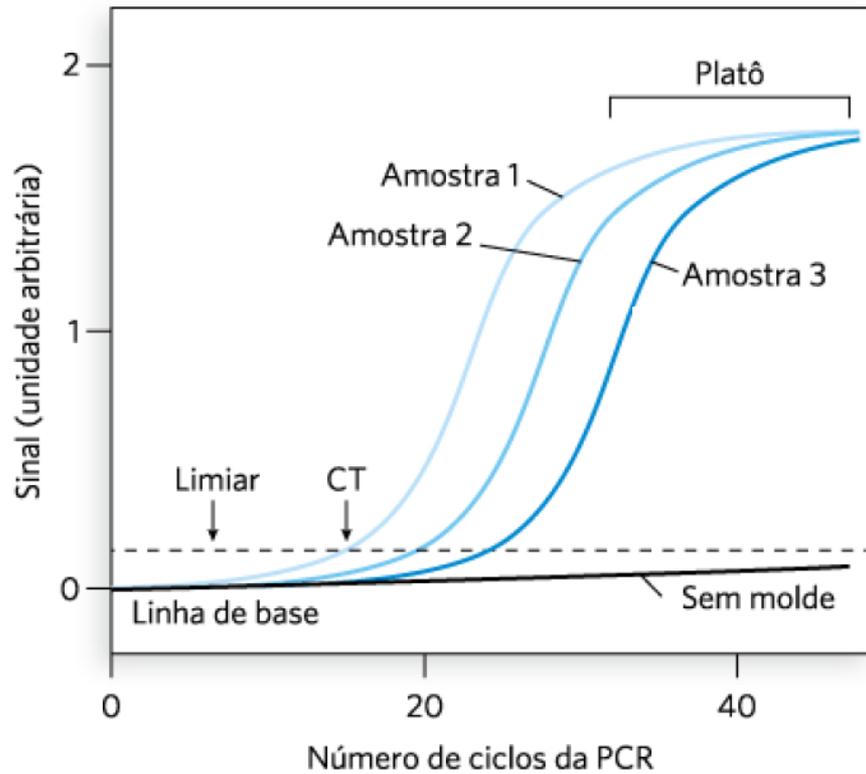
2. Emission of the fluorescence by binding

PCR - ciclos: 1 2 3



A fluorescência do Sybr Green é proporcional a quantidade de produto de PCR gerado
A fluorescência é maior quando o corante está intercalado na dupla fita de DNA

Medida da fluorescência



A intensidade da fluorescência em um dado ciclo é proporcional a concentração do DNA molde na amostra

→ Controle negativo

C_T (Cycle Threshold) ou C_q (Cycle quantification):

Número de ciclos em que a fluorescência detectada ultrapassa o limite da fluorescência basal (*threshold*)

A quantidade de cópias da sequencia-alvo geradas na PCR depende da quantidade inicial de amostra (DNA molde)

CICLOS	Amostra 3	Amostra 2	Amostra 1
	2	4	8
1	4	8	16
2	8	16	32
3	16	32	64
4	32	64	128
5	64	128	256
6	128	256	512
7	256	512	1.024
8	512	1.024	2.048
9	1.024	2.048	4.096
10	2.048	4.096	8.192
11	4.096	8.192	16.384
12	8.192	16.384	32.768
13	16.384	32.768	65.536
14	32.768	65.536	131.072
15	65.536	131.072	262.144
16	131.072	262.144	524.288
17	262.144	524.288	1.048.576
18	524.288	1.048.576	2.097.152
19	1.048.576	2.097.152	4.194.304
20	2.097.152	4.194.304	8.388.608
21	4.194.304	8.388.608	16.777.216
22	8.388.608	16.777.216	33.554.432
23	16.777.216	33.554.432	67.108.864
24	33.554.432	67.108.864	134.217.728
25	67.108.864	134.217.728	268.435.456

Aplicações da PCR e qPCR

Genotipagem do DNA (Diagnóstico molecular)

Identificação de indivíduos (teste de paternidade, medicina forense)

Diagnóstico de doenças genéticas

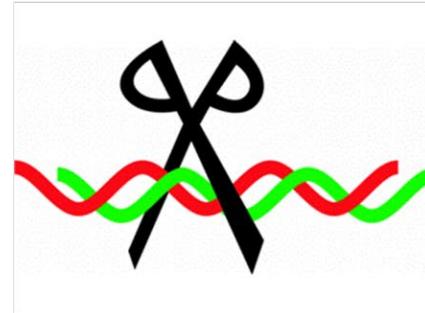
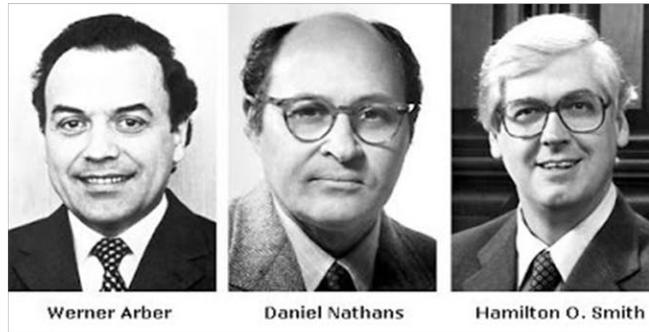
Detecção de infecção/contaminação por bactérias, vírus ou fungos

Obtenção de amplicons para sequenciamento

Obtenção de segmentos de DNA de interesse para clonagem molecular (obtenção de proteínas recombinantes) (PCR convencional)

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

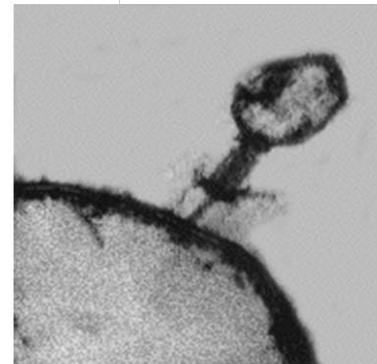
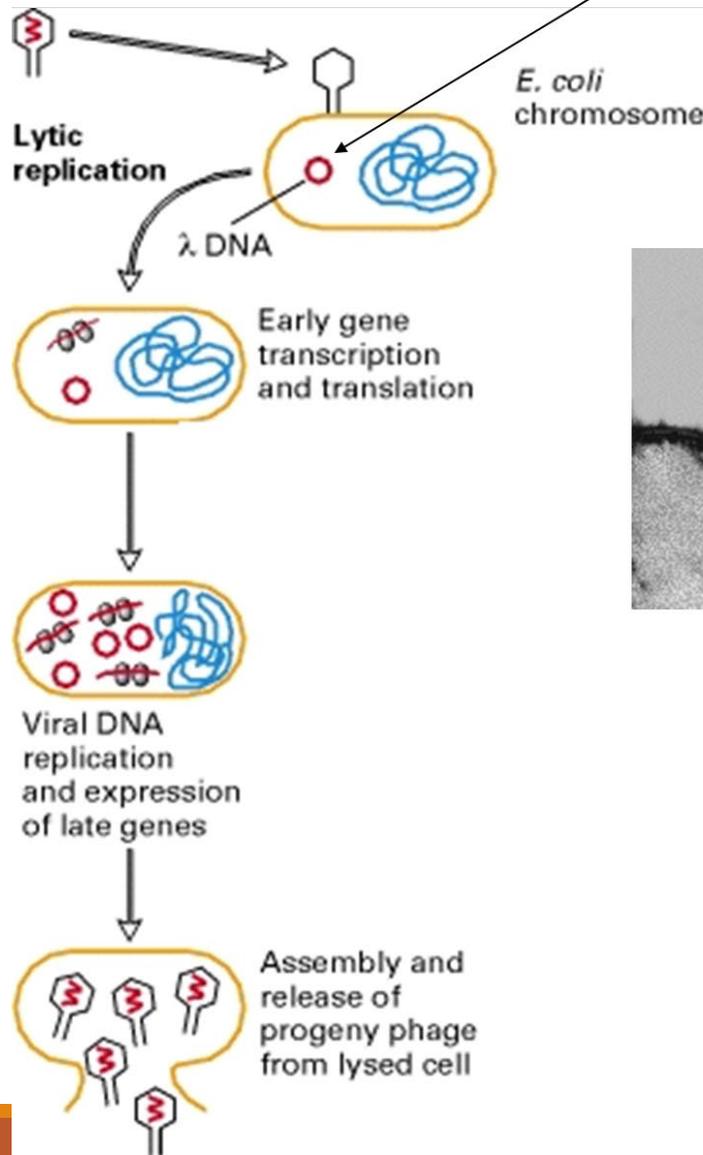
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978

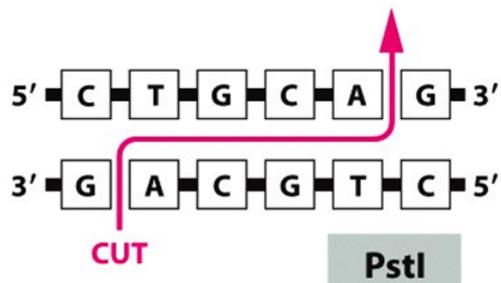
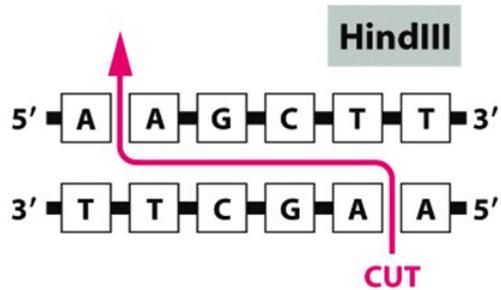
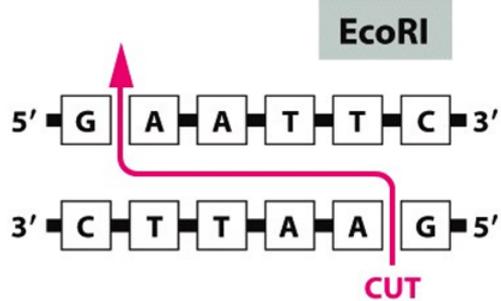
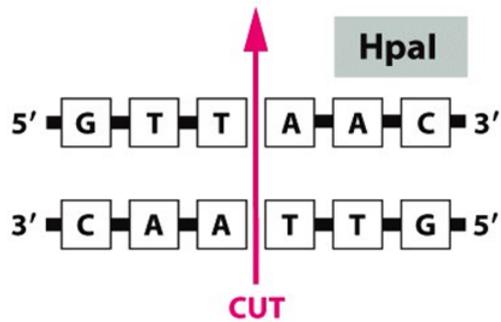


- Descobertas no final da década de 60.
- Presentes em diversos procariotos (função de clivar moléculas de DNA estranhas)
- Endonucleases que reconhecem seqs. específicas de DNA dupla fita e clivam as duas fitas.
- As sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição são palindrômicas

Ciclo lítico do bacteriófago lambda (λ)

Enzimas de restrição: enzimas presentes em bactérias que restringem DNA estranho à célula

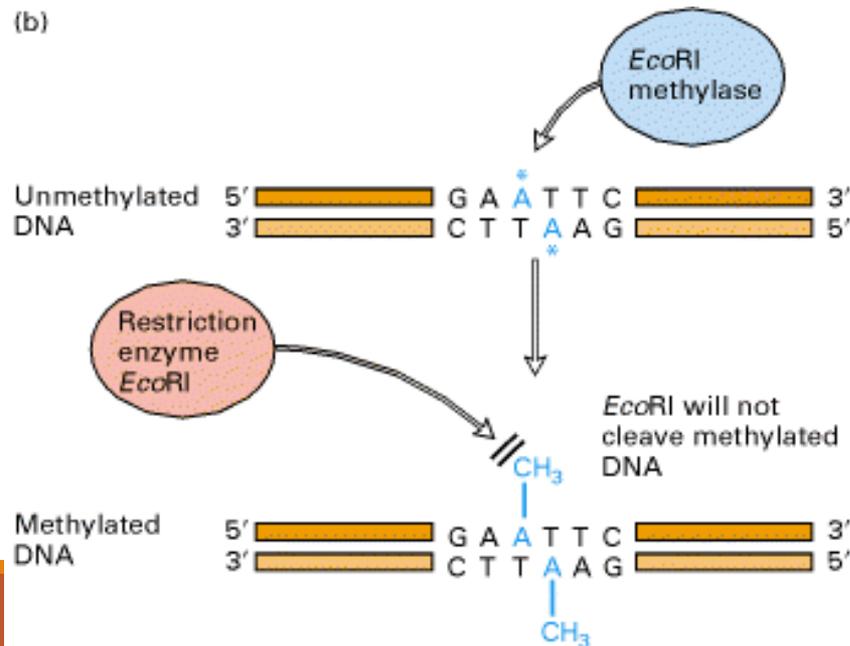
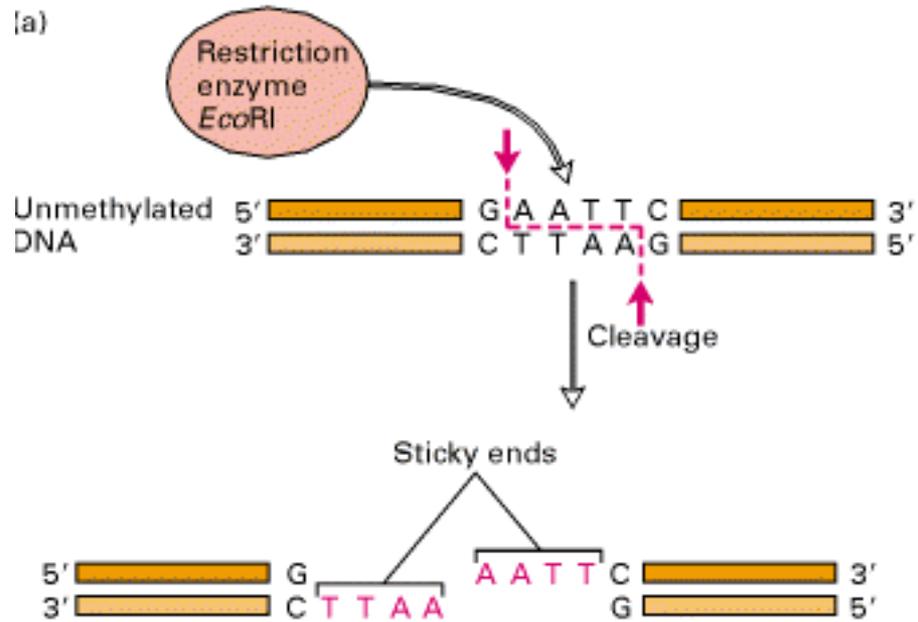




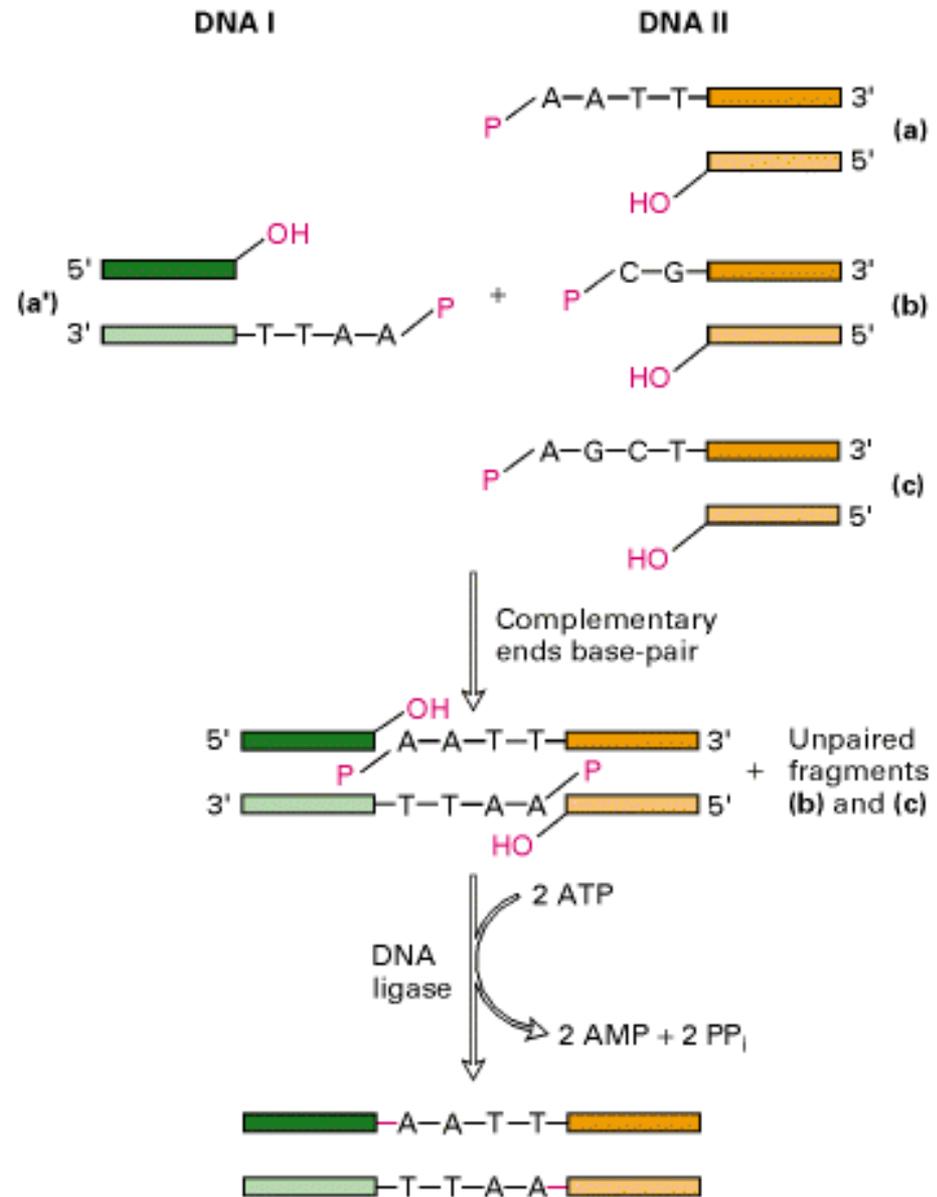
HpaI *Hemophilus parainfluenzae*
EcoRI *Escherichia coli*
HindIII *Hemophilus influenzae*
PstI *Providencia stuartii*.

Sequências
palindrômicas

4-8 pbs



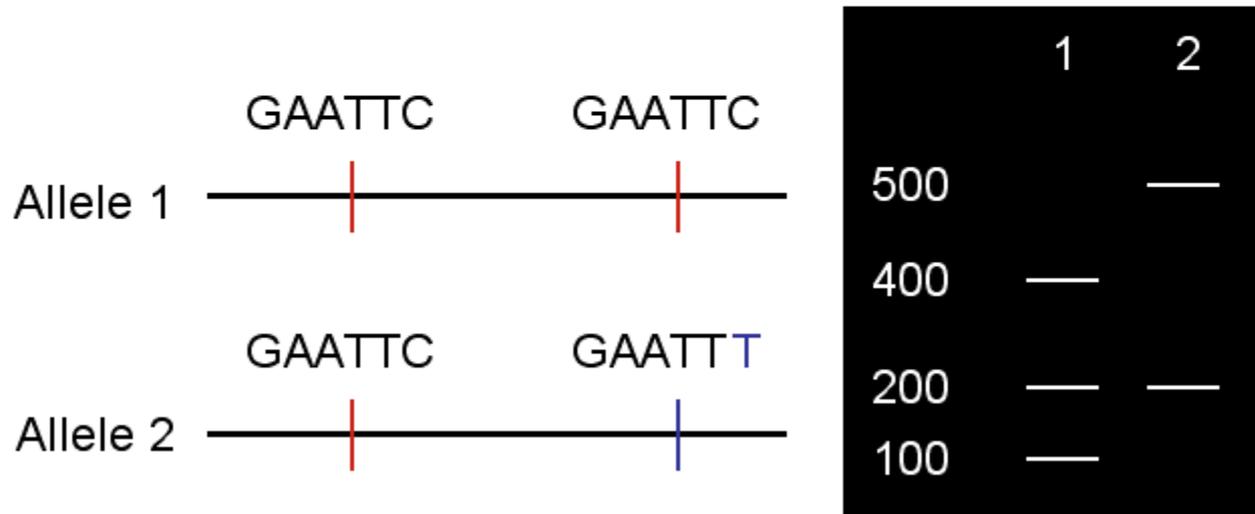
Extremidades
coesivas podem ser
ligadas por
complementaridade



Polimorfismo dos fragmentos de restrição - RFLP

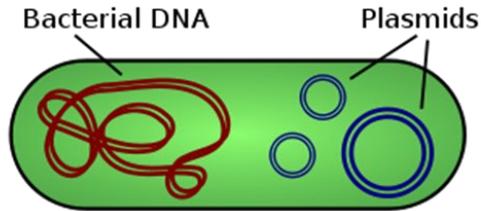
Restriction Fragment Length Polymorphism

700 base pair PCR fragment

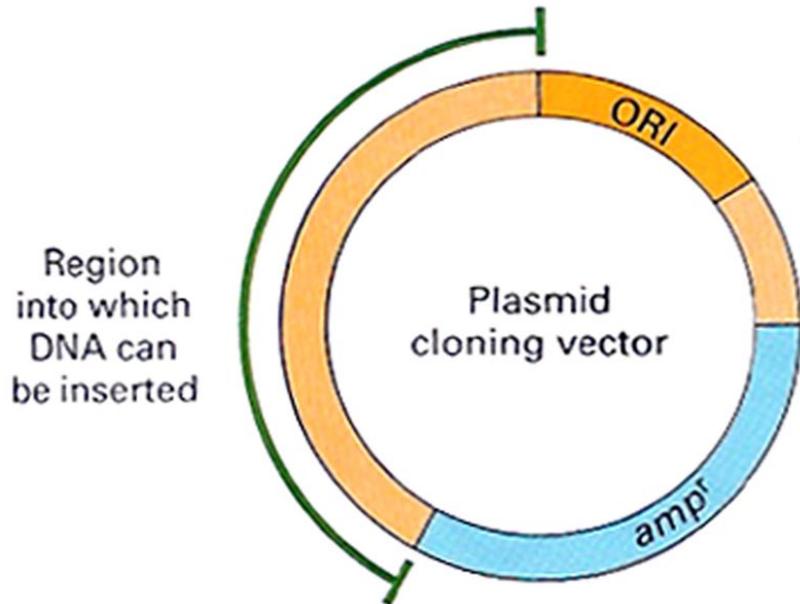


Plasmídeos

Originalmente encontrados em bactérias, leveduras

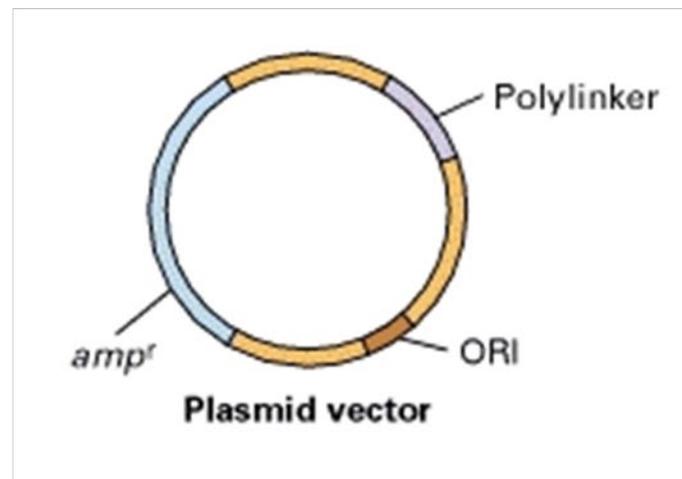
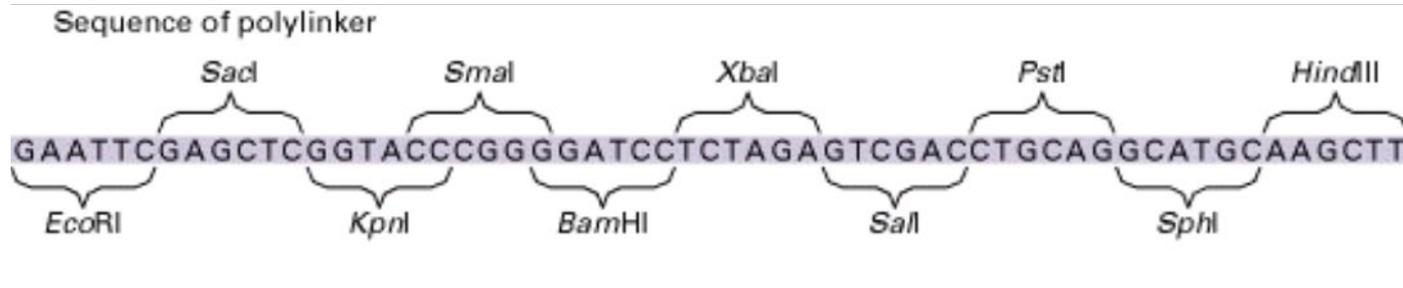


Plasmídeos como vetor de clonagem



Gene amp^R codifica para a enzima β -lactamase, que degrada o antibiótico ampicilina (marcador de seleção)

Sítio múltiplo de clonagem (*polylinker*) em vetores plasmidiais



Inserção de um DNA em um plasmídeo

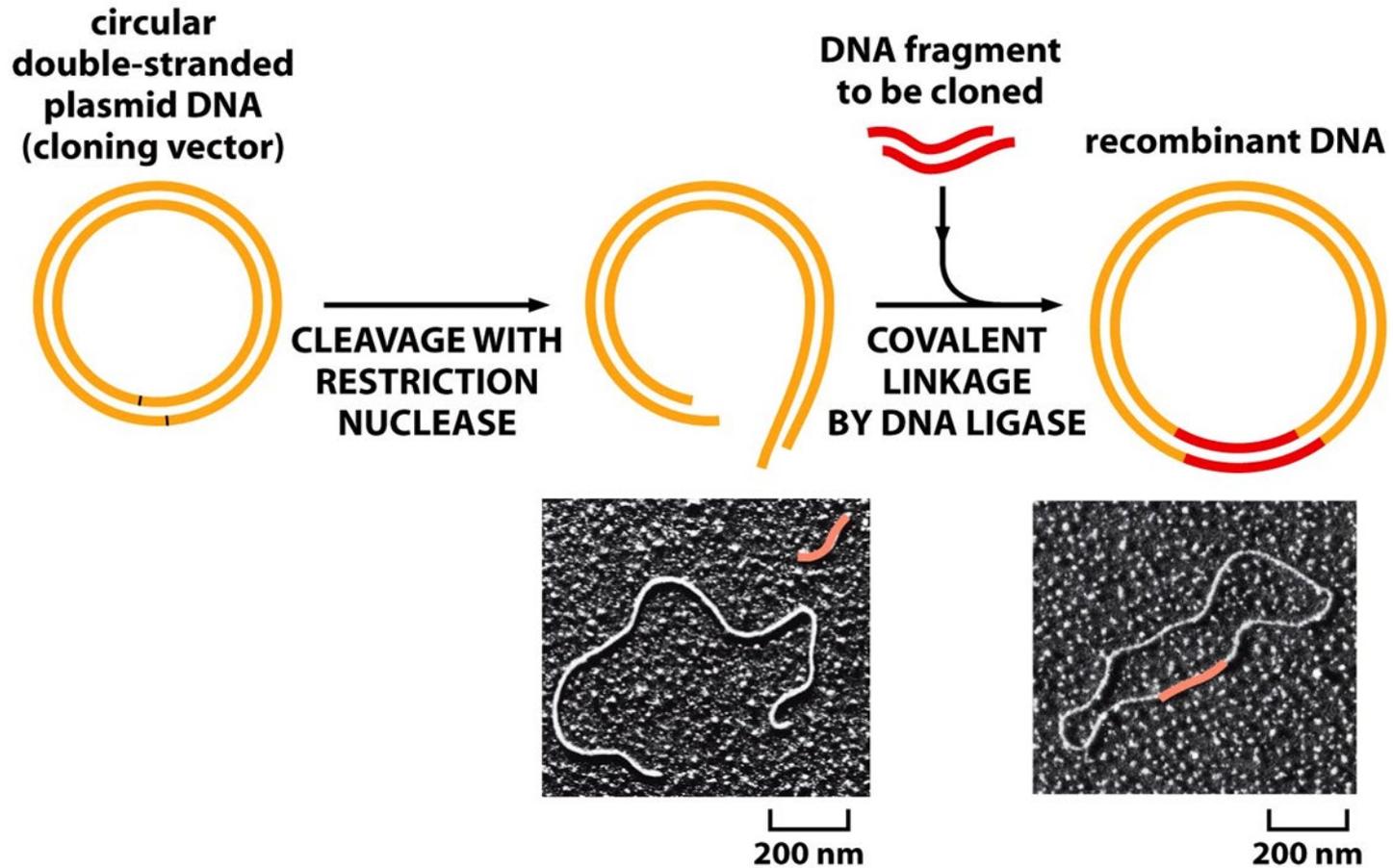
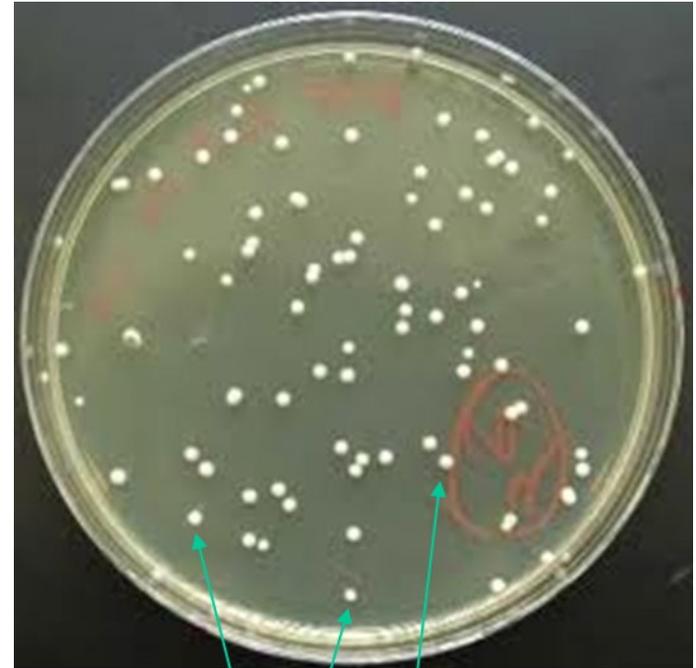
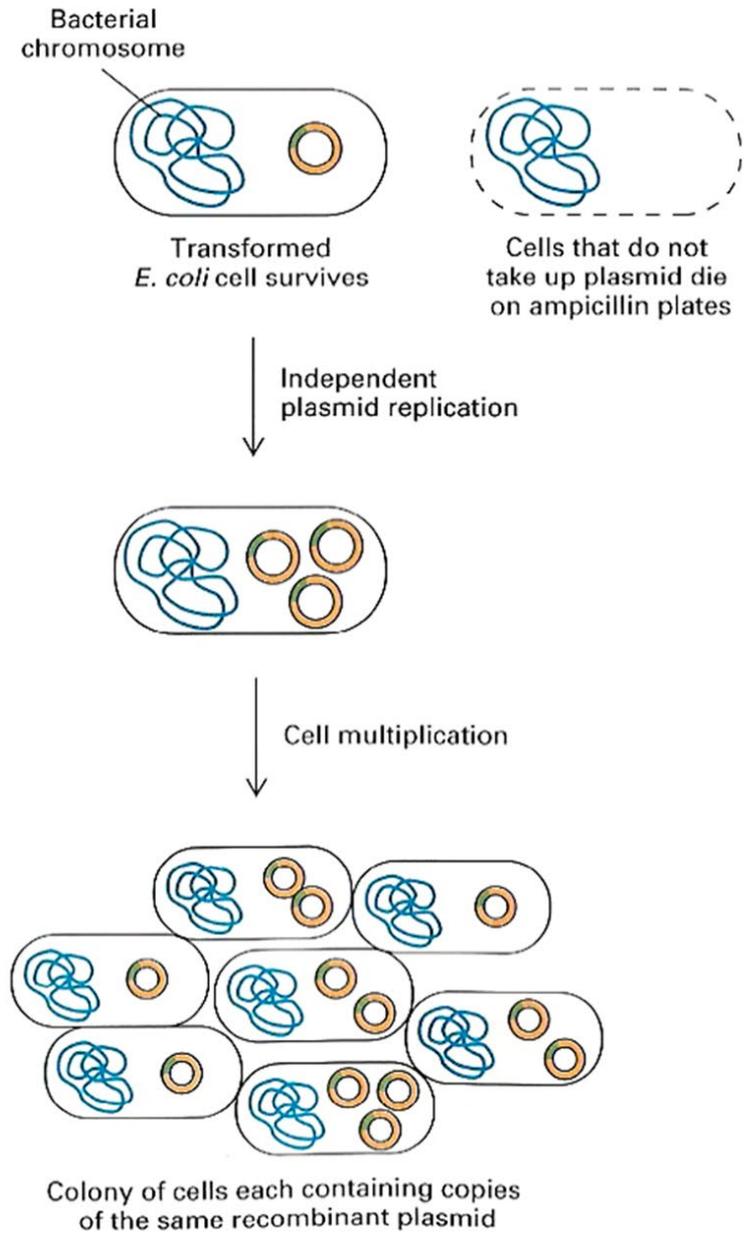


Figure 8-39 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Transformação bacteriana



Colônias de *E.coli*

Amplificação do DNA clonado

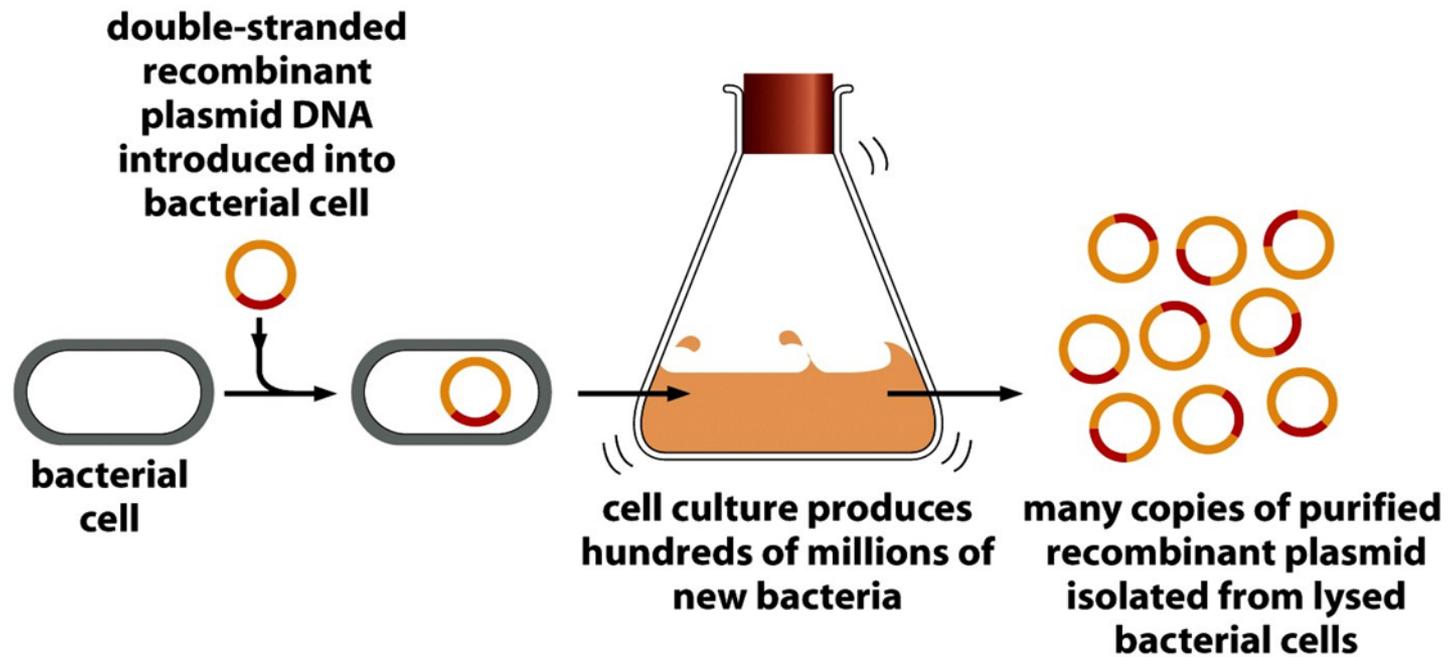


Figure 8-40 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)