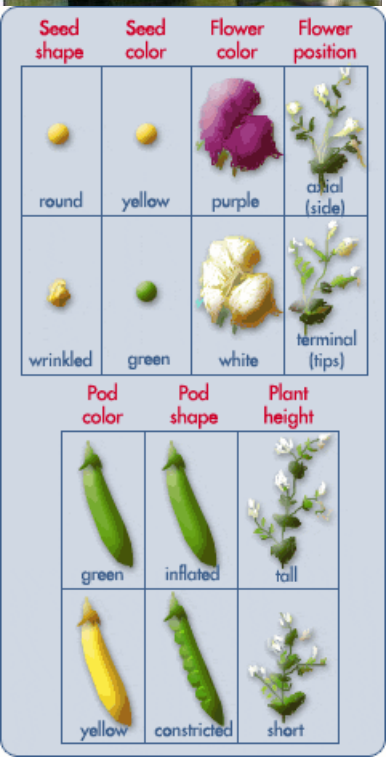
TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE E CLONAGEM

Homo sapiens: UMA ESPÉCIE TECNOLÓGICA

- **Antes de compreender já explorava os recursos naturais.**
- **Exploração da biotecnologia: cultivar plantas, criar animais, fermentação.**
- **Entender os seres vivos ou parte deles: produtos e serviços.**

SERES VIVOS: HEREDITARIEDADE E VARIAÇÃO

- Mecanismos desconhecidos.
- Cruzamentos experimentais → híbridos instáveis.
- Resultados imprevisíveis e instáveis.



MENDEL E AS LEIS DA HERANÇA

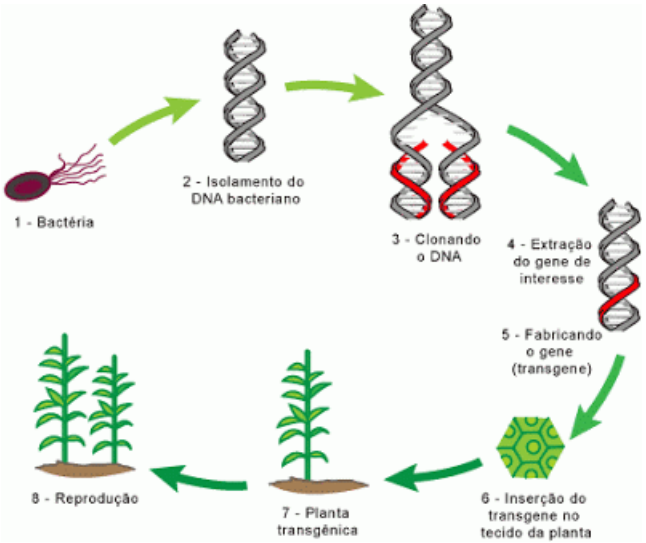
- Resultados previsíveis e estáveis.
- Manipulação de cruzamentos e melhoramento genético.
- Novos estudos e novas aplicações.

MAIS CONHECIMENTO E MAIS BIOTECNOLOGIA

Novos conhecimentos e novas aplicações: teoria cromossômica da herança; estrutura e funções do material genético; tecnologia do DNA recombinante e engenharia genética.

❖ Engenharia Genética ou **Tecnologia do DNA Recombinante** é um conjunto de técnicas que permite aos cientistas identificar, isolar e multiplicar e expressar genes de quaisquer organismos.

Manipulação gênica feita em ambiente de laboratório

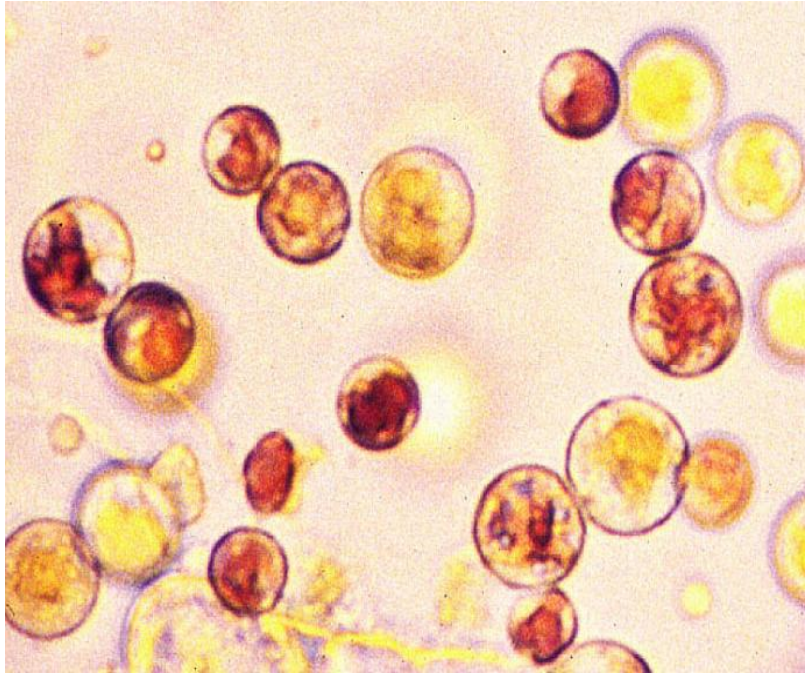


FERRAMENTAS UTILIZADAS NA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE.

- Clonagem de genes de interesse para expressão e produção de proteínas recombinantes: insulina, hormônio de crescimento → genes de humanos clonados em bactérias;
- Plantas transgênicas;
- Animais transgênicos.
- PCR;
- Bibliotecas genômicas;
- Vetores;
- Sequenciamento de DNA;
- Hibridização;
- Eletroforese.

PRECISA ISOLAR O DNA...MAS DE ONDE E COMO?

Clonagem <u>dependente</u> de células



Clonagem <u>independente</u> de células (PCR)

Clonagem: obtenção de uma grande quantidade de uma determinada sequencia de DNA de interesse

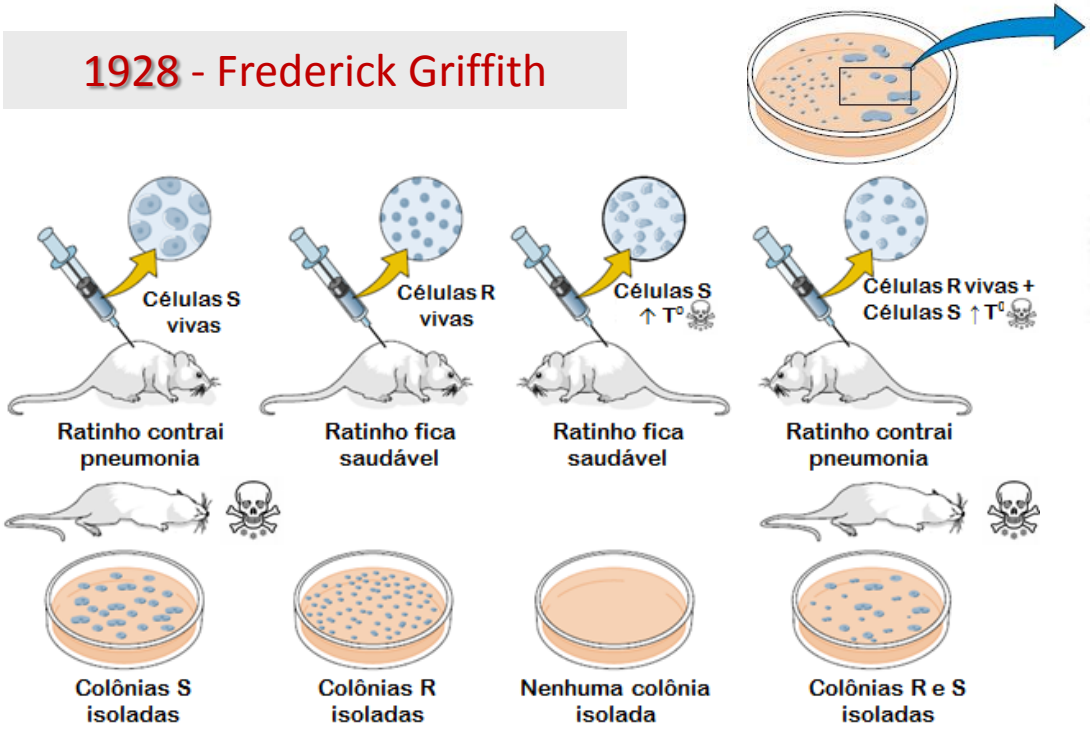
CLONAGEM CELULAR

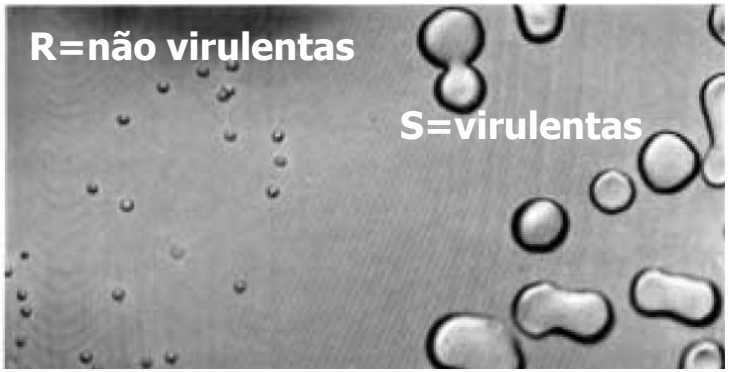
CÓPIAS IDENTICAS!!

HISTÓRICO DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE (TDR)

1944 - Oswald Avery descobre que o DNA é o componente que transmite as informações genéticas e que este é o principal constituinte dos genes.

1928 - Frederick Griffith





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

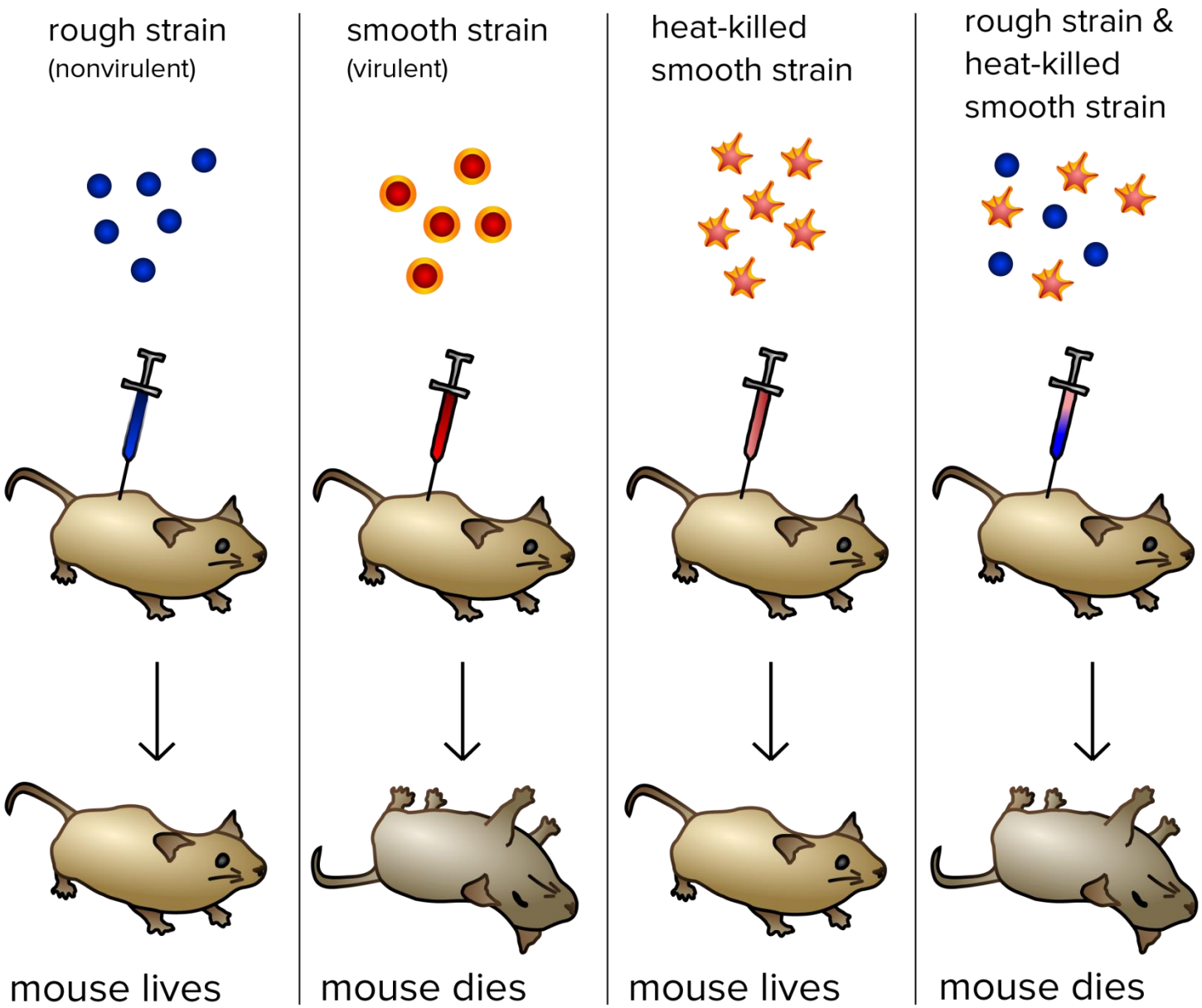
Daí entra Oswald Avery ...

a. A atividade de transformação das células **S** não é destruída pelo calor.

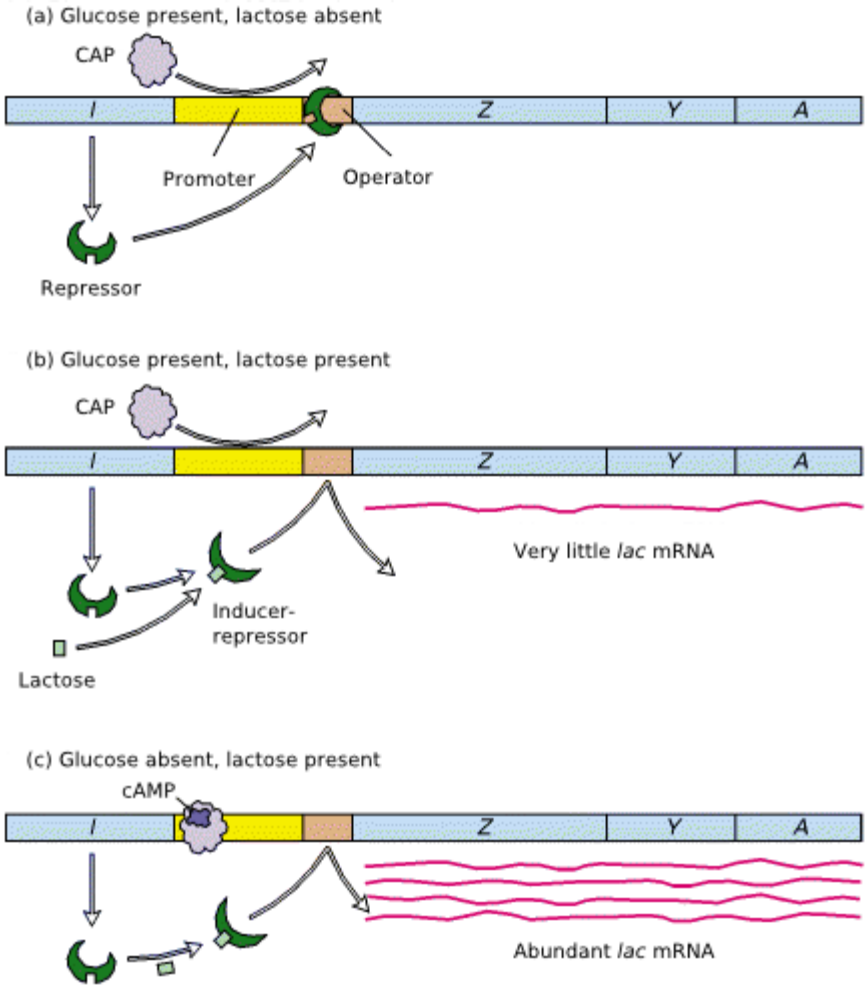
b. A atividade de transformação das células **S** não é destruída por proteases ou RNases.

c. A atividade de transformação das células S é destruída por DNases.

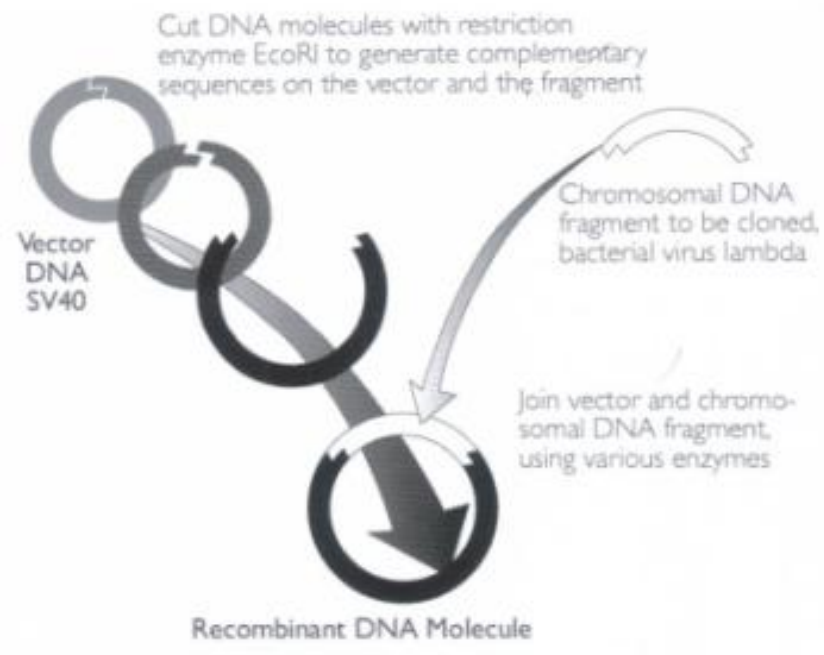
PRINCÍPIO TRANSFORMANTE


rough strain
(nonvirulent)
smooth strain
(virulent)
heat-killed
smooth strain
rough strain &
heat-killed
smooth strain
mouse lives
mouse dies
mouse lives
mouse dies

1961 - François Jacob e Jacques Monod estudaram o processo de síntese de proteínas nas 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: ele ligou uma cadeia de DNA do fago λ junto ao operon da galactose de *Escherichia coli*, inserindo-os no DNA do vírus SV40.

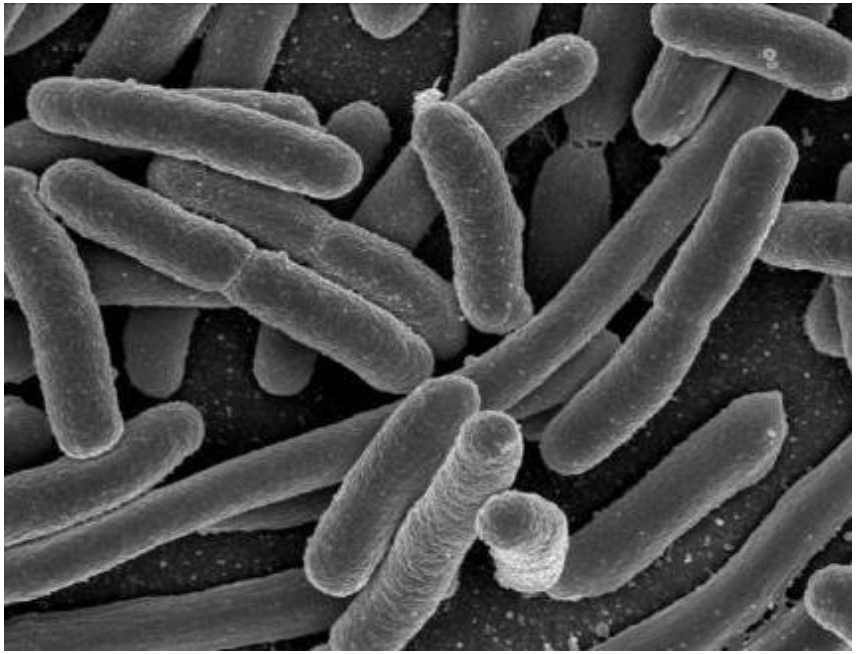


Jackson, D.A., Symons, R.H. & Berg, P. Biochemical meth
information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc Nat Acad Sci USA **69**, 2904-2909 (October 1972)

O grande marco...

Cohen e Boyer (1973)

+



COHEN E BOYER (1973)

- 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.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 70, No. 11, pp. 3240–3244, November 1973

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

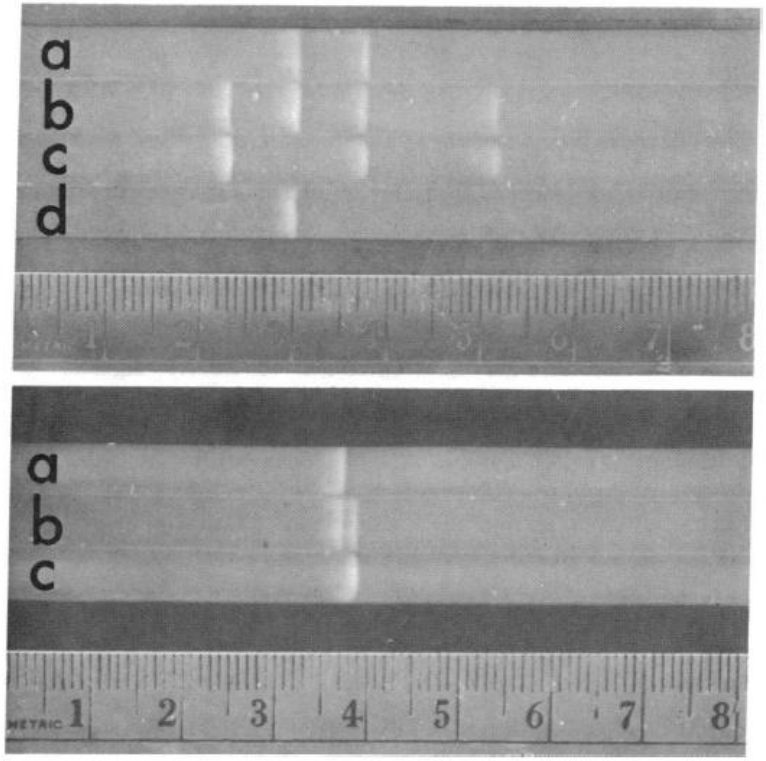
(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

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-**



COMO FAZER UM DNA RECOMBINANTE

Organismo de interesse

⇩

Extração do DNA total

⇩

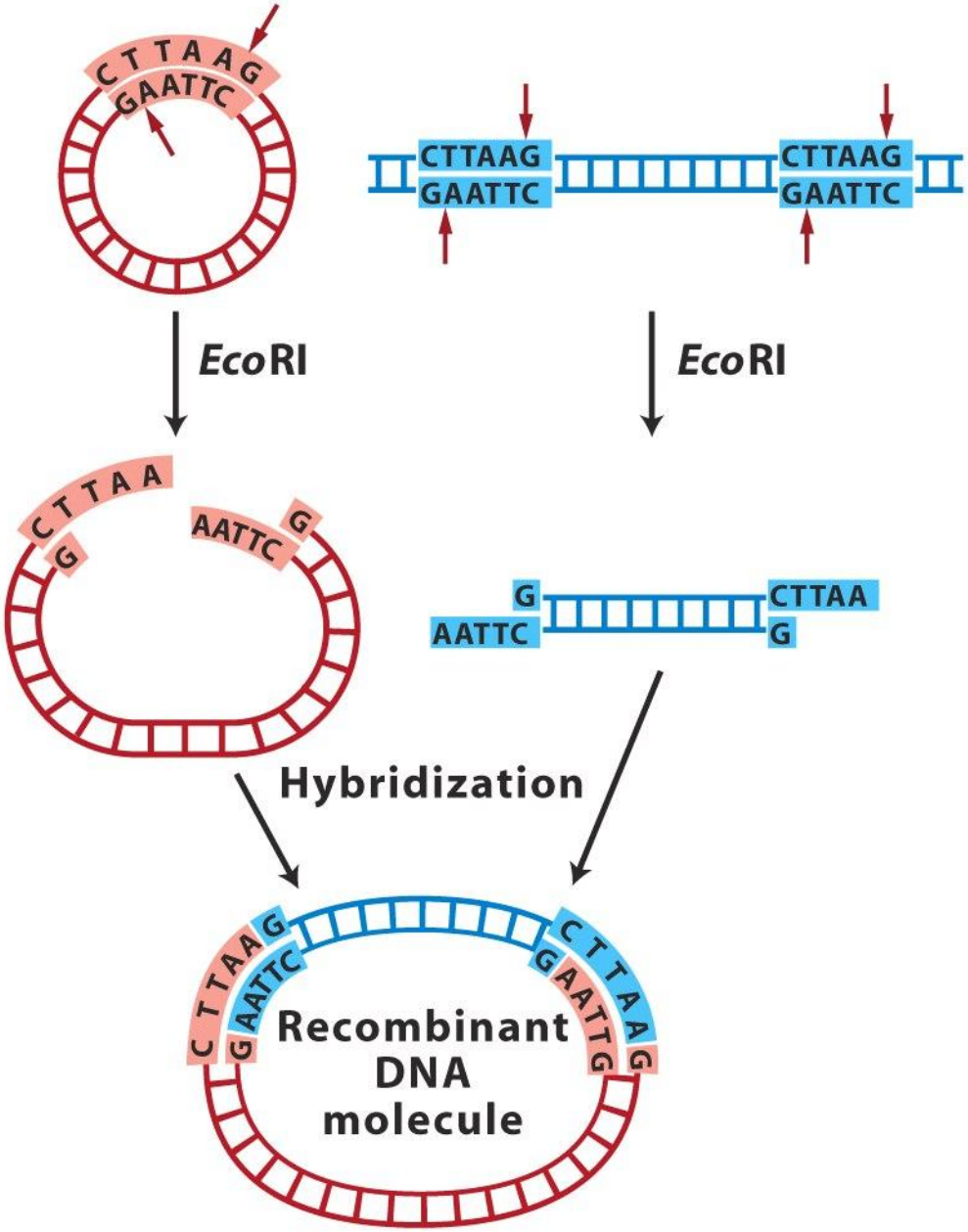
Clivagem do DNA genômico ou PCR

⇩

Clonagem dos fragmentos em vetores

⇩

Armazenamento dos vetores em hospedeiros

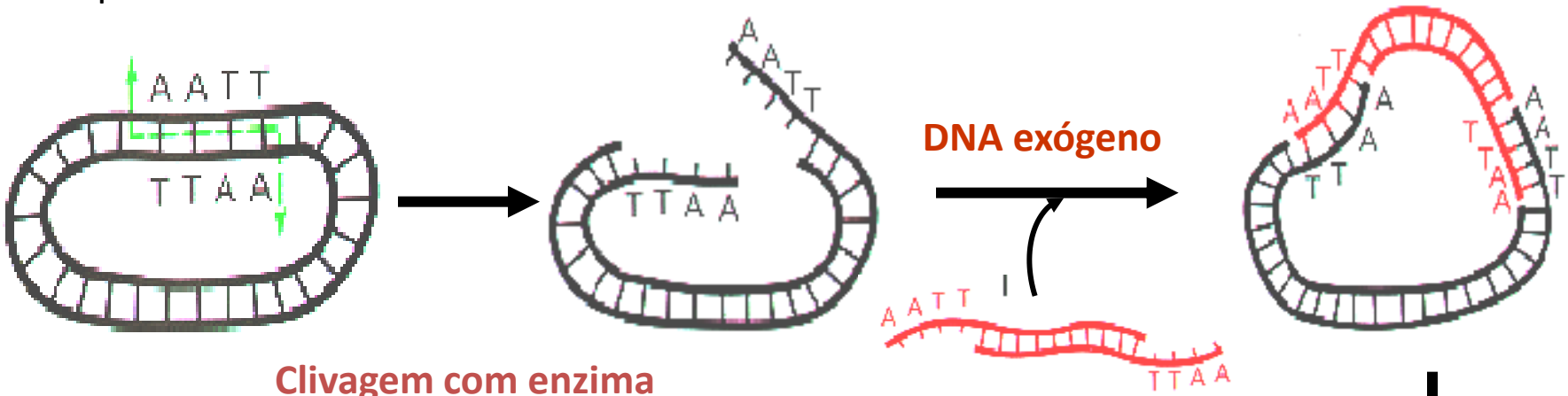


Formação de uma molécula de DNA recombinante

CONSTRUÇÃO DO DNA RECOMBINANTE

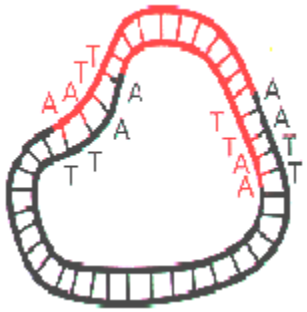
Molécula de DNA de um plasmídeo **circular**

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



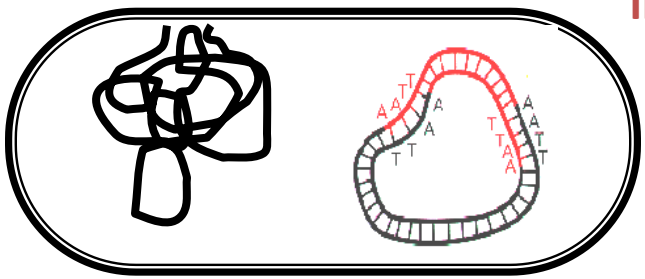
Clivagem com enzima de restrição

Ligação covalente pela DNA ligase



Molécula de DNA plasmidial contendo o **inserto**

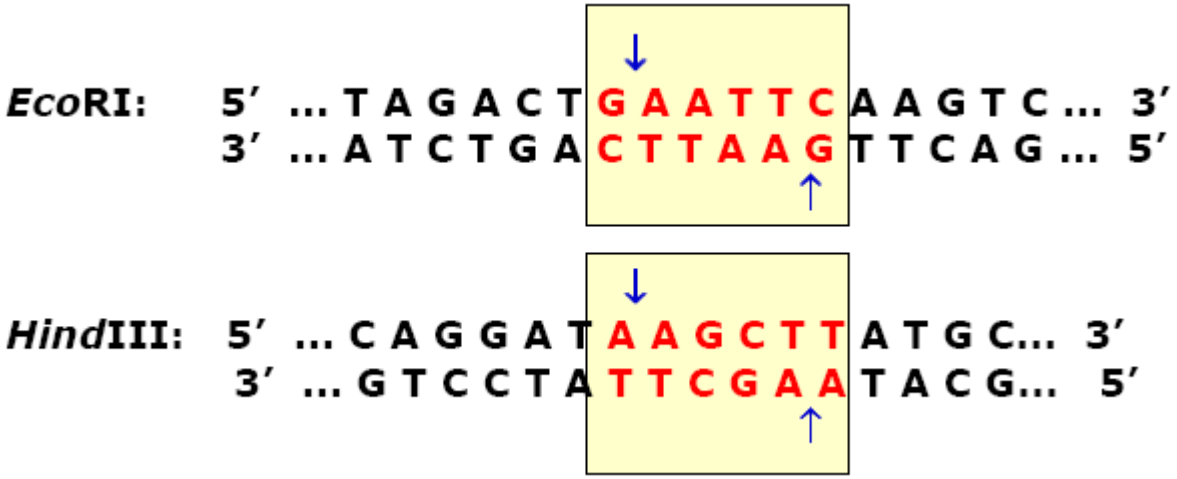
Inserção em uma célula hospedeira



Transformação

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

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



CARACTERÍSTICAS

- **Enzimas de restrição são endonucleases;**
- Enzimas 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.

NOMENCLATURA

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

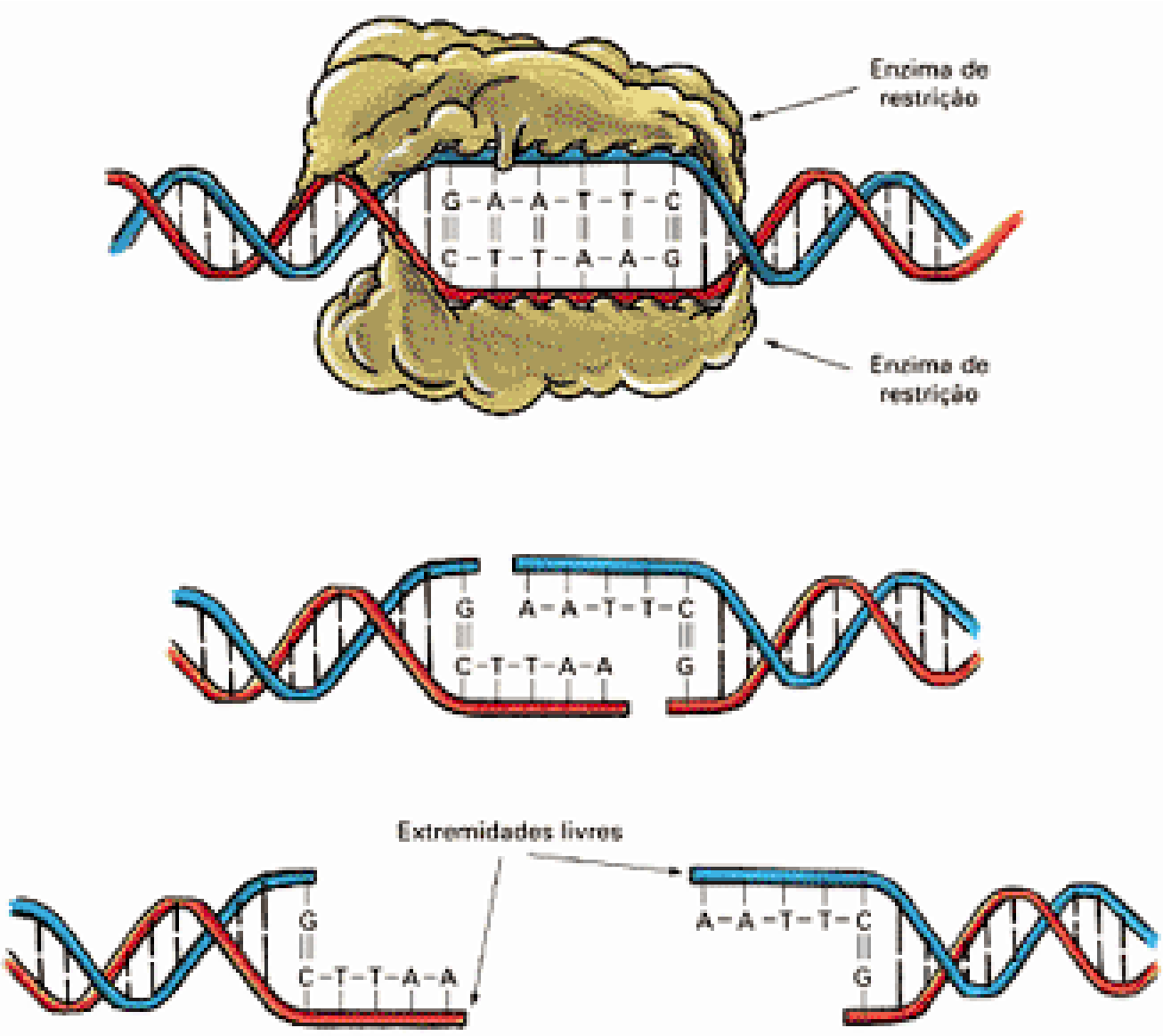
Exemplo: ***Eco*R I**

Género → *Escherichia*

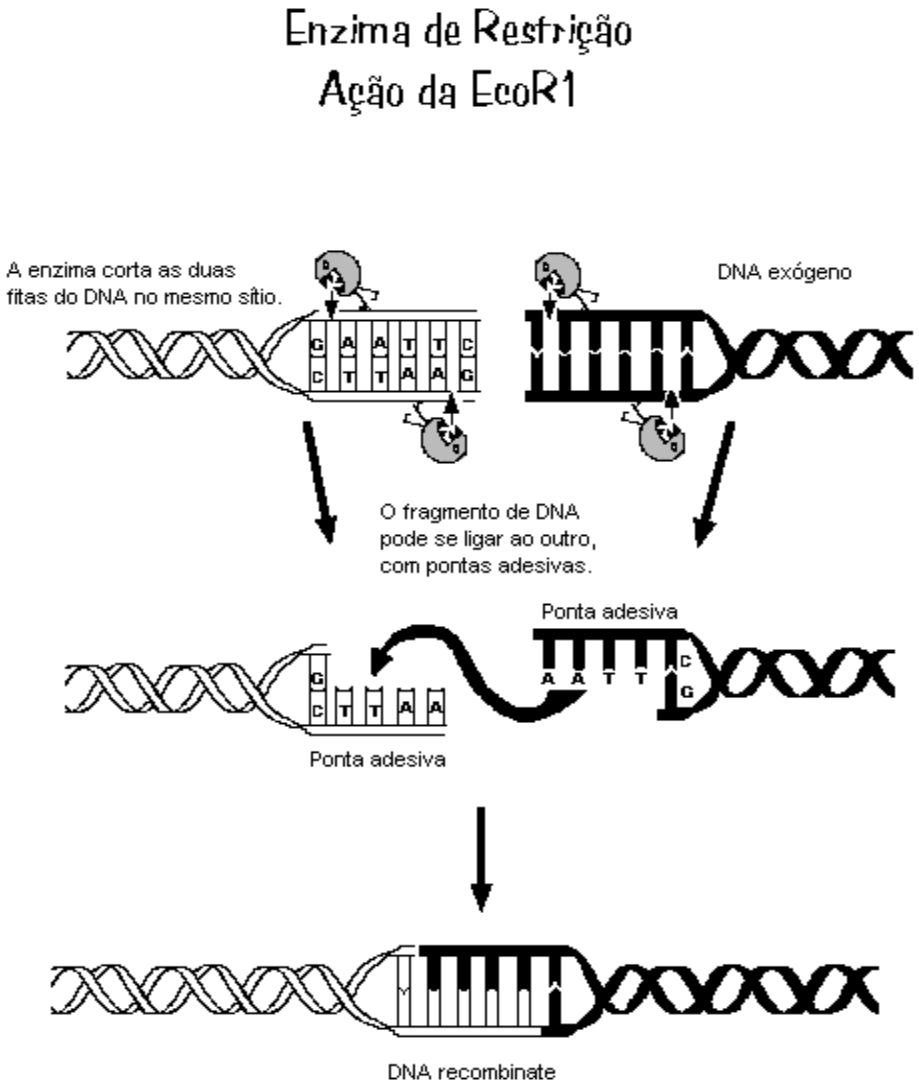
Espécie → *coli*

Estirpe → RY 13

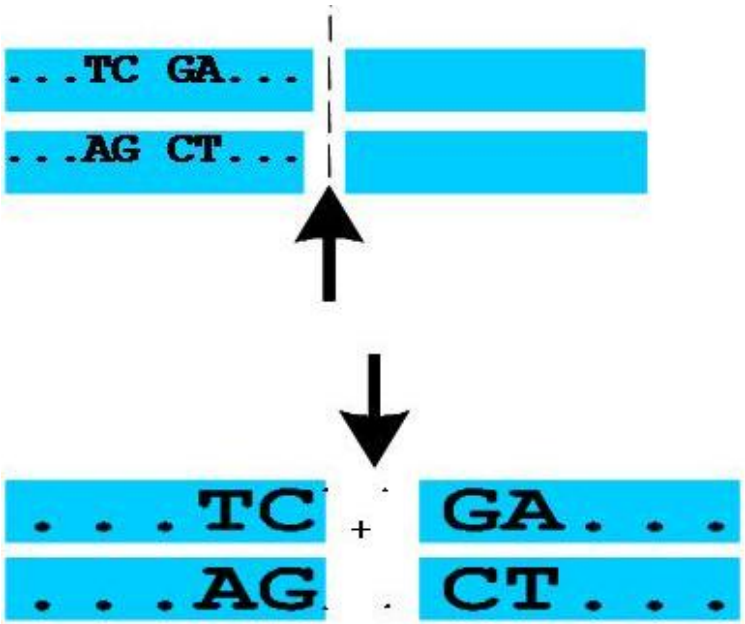
Ordem de descoberta → 1º enzima a ser descoberta nesta bactéria


Enzima de restrição
G-A-A-T-T-C
C-T-T-A-A-G
Enzima de restrição
G
A-A-T-T-C
C-T-T-A-A
G
Extremidades livres
G
C-T-T-A-A
A-A-T-T-C
G

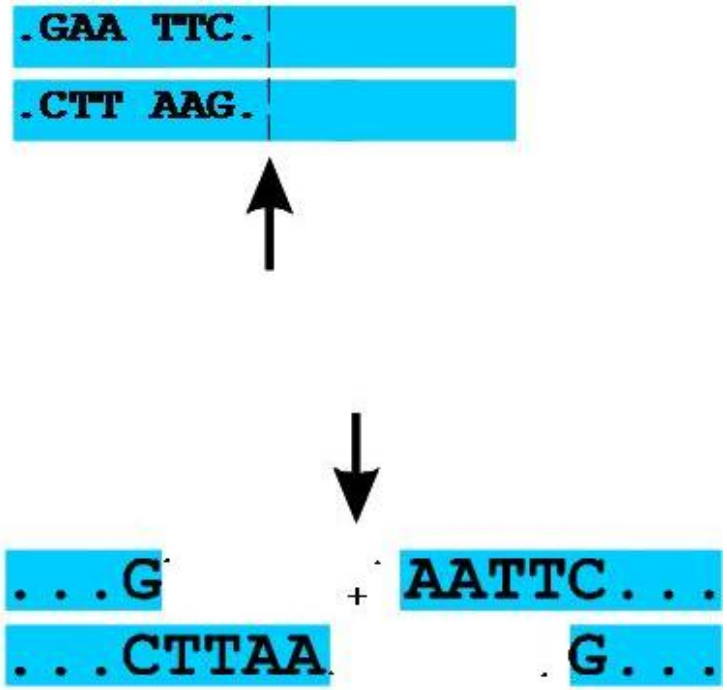
E ASSIM RECOMBINO DNA



DOIS TIPOS DE CORTES...



Moléculas com extremidades cegas

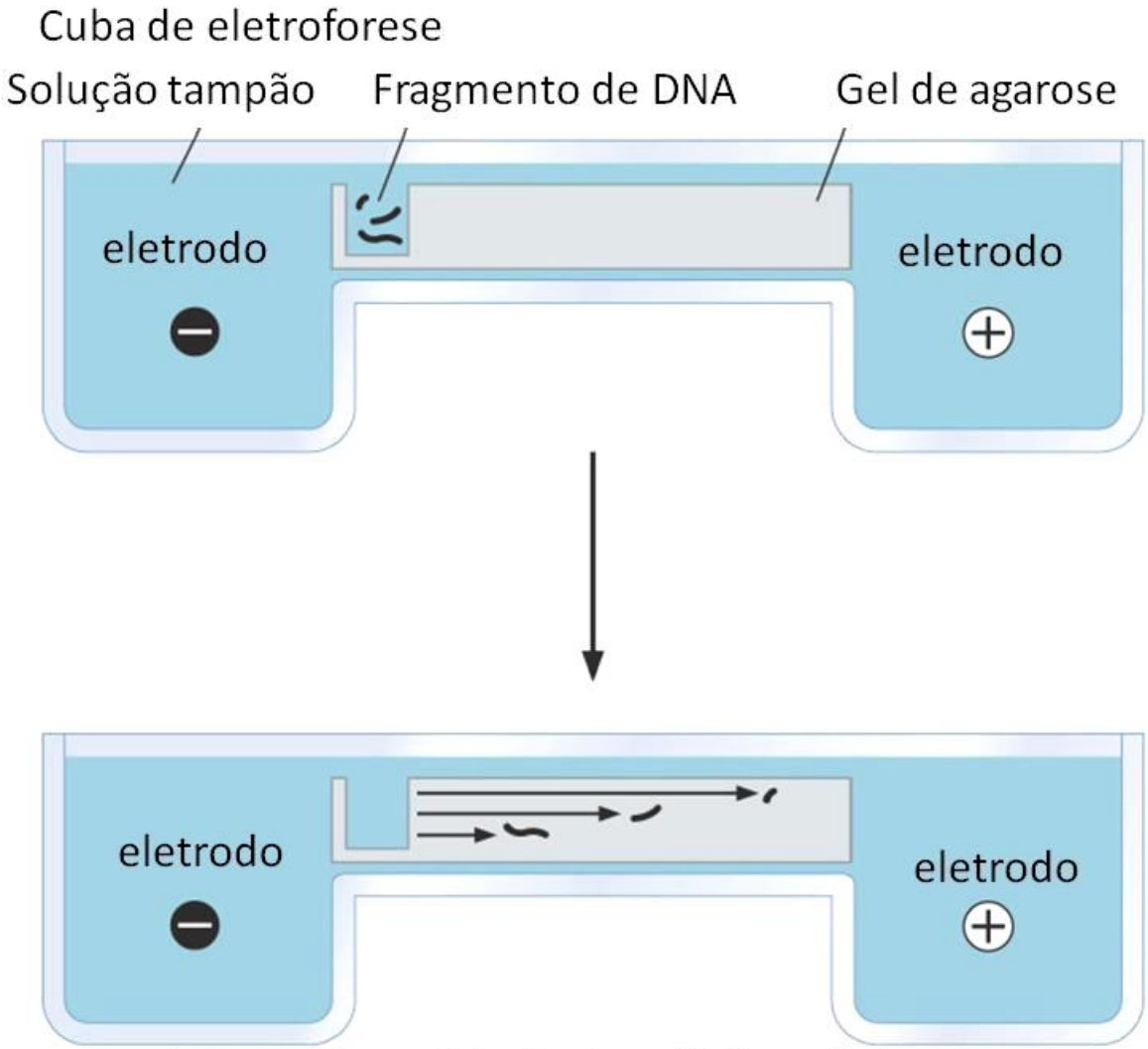


Moléculas com extremidades coesivas

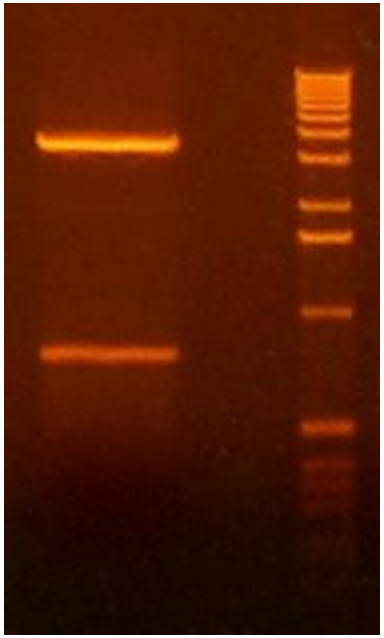
EXISTEM VÁRIAS ENZIMAS...

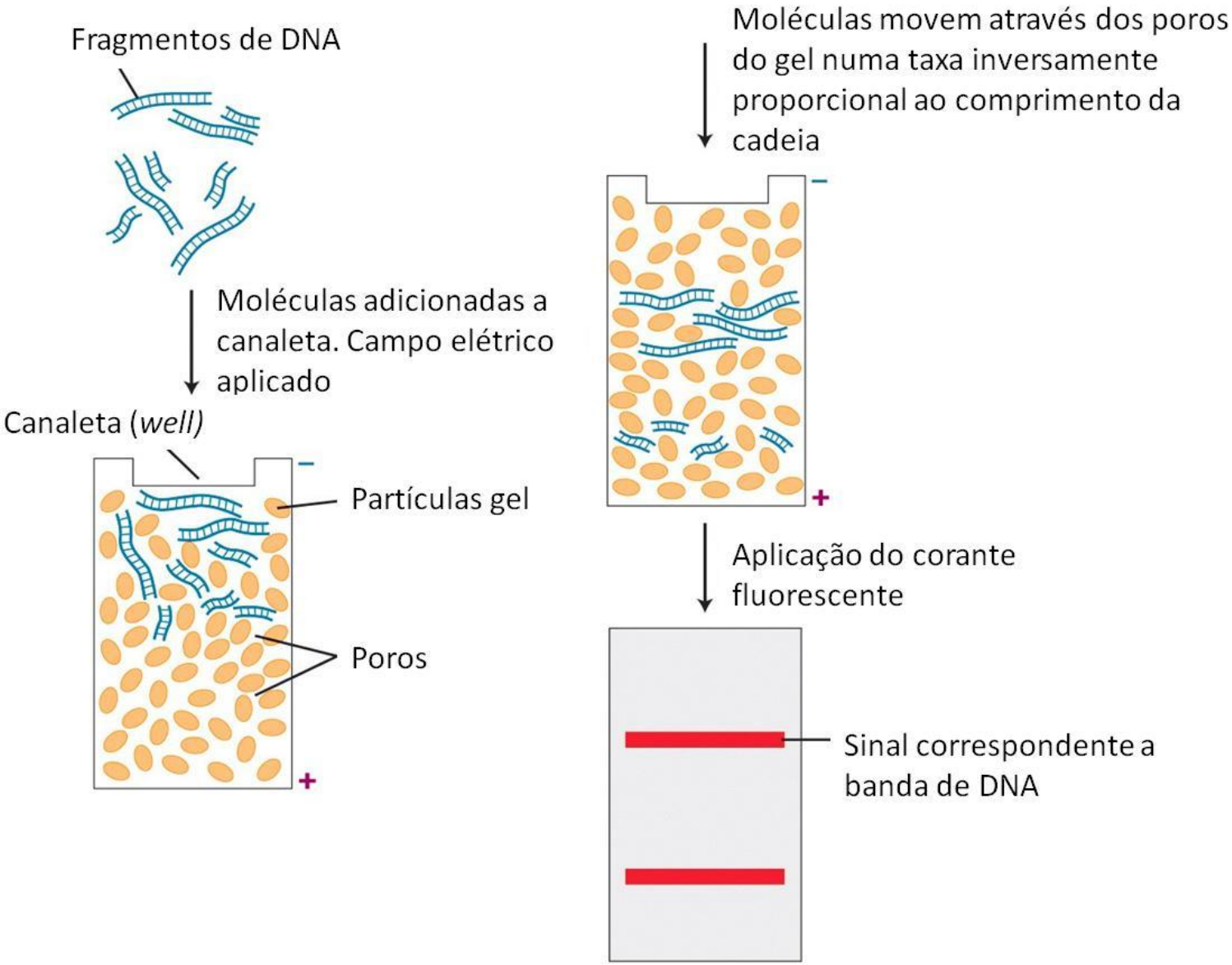
Microrganismo	Enzima	Sequência Alvo
Escherichia coli	*Eco*RI	G A | A T T C C T | T A A G
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G G | A T C C C C | T A G G
Bacillus globigii	*Bgl*II	A G | A T C T T C | T A G A
Haemophilus aegyptius	*Hae*II	Pu G | C G C Pi Pi C | G C G Pu
Haemophilus aegyptius	*Hind*III	A A | G C T T T T | C G A A
Providencia stuartii	*Pst*I	C T | G C A G G A | C G T C
Streptococcus albus G	*Sal*I	G T | C G A C C A | G C T G
Thermus aquaticus	*Taq*I	T C G A A G C T
Brevibacterium albidium	*Bal*I	T G | G C C A A C | C G G T
Haemophilus aegyptius	*Hae*III	A G | G C C T T C | C G G A
Serratia marcescens	*Sma*I	C C | C G G G G G | G C C C

ELETROFORESE

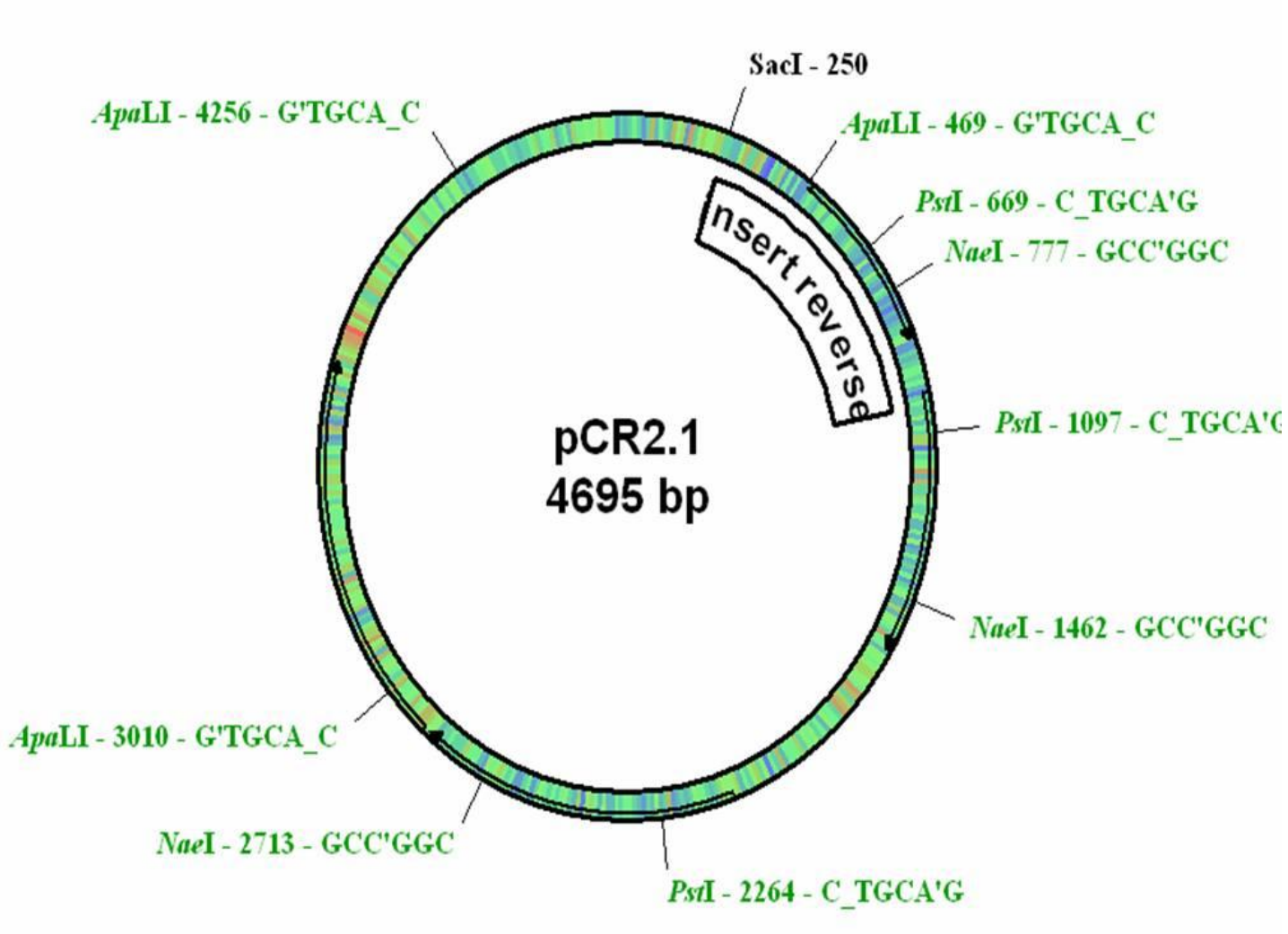


Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings




Fragmentos de DNA
Moléculas adicionadas a canaleta. Campo elétrico aplicado
Canaleta (*well*)
Partículas gel
Poros
Moléculas movem através dos poros do gel numa taxa inversamente proporcional ao comprimento da cadeia
Aplicação do corante fluorescente
Sinal correspondente a banda de DNA

VAMOS VER SE EU APRENDI….



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

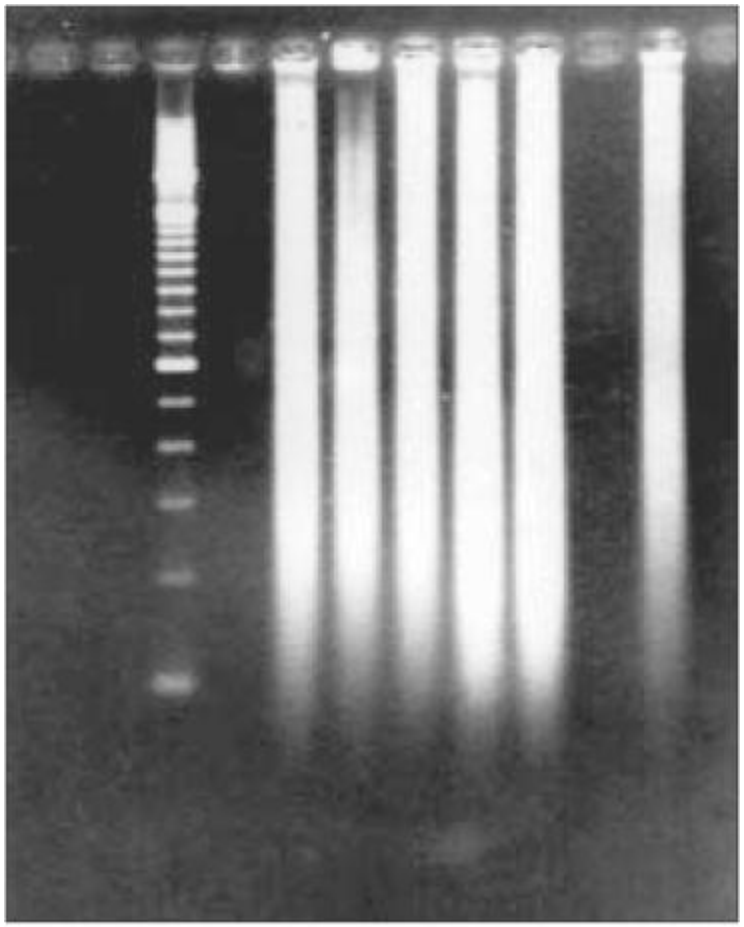
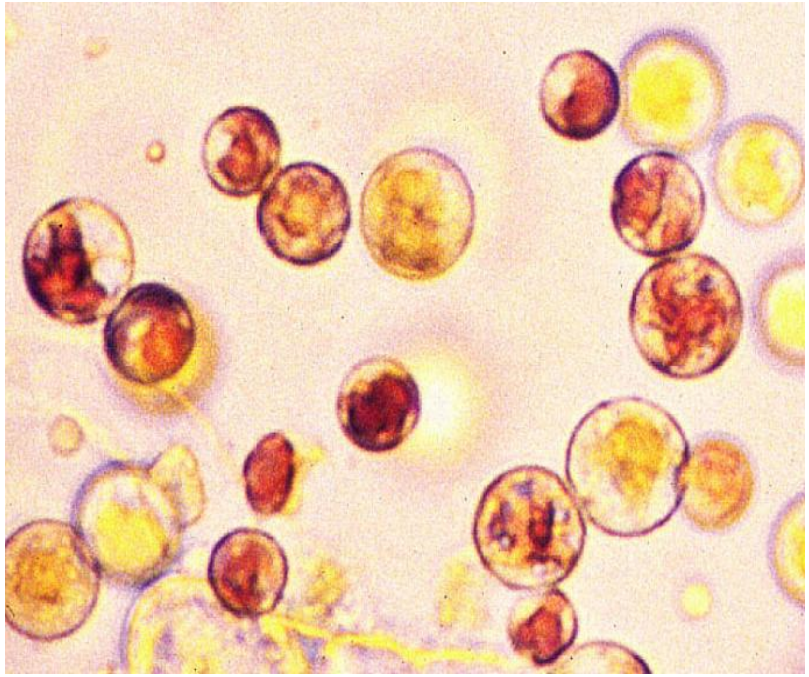


Figura 1 – *Amostras de DNA total, extraídas de fragmentos de leiomiomas uterinos embebidos em parafina e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%*

CLONAGEM DEPENDENTE DE CÉLULAS VIVAS

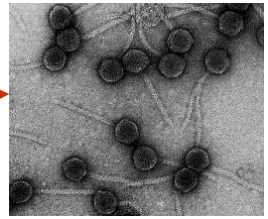


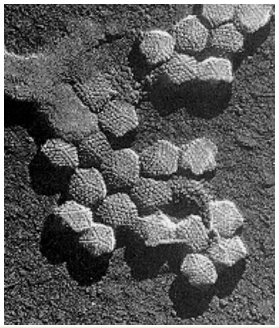
CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA

Ferramentas de clonagem:

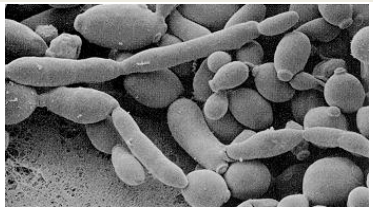
Enzimas: **enzimas de restrição**
DNA ligase

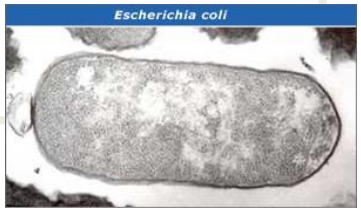
Vetores: plasmídios
fagos (vírus de bactérias)
cosmídeos
cromossomos artificiais
vírus



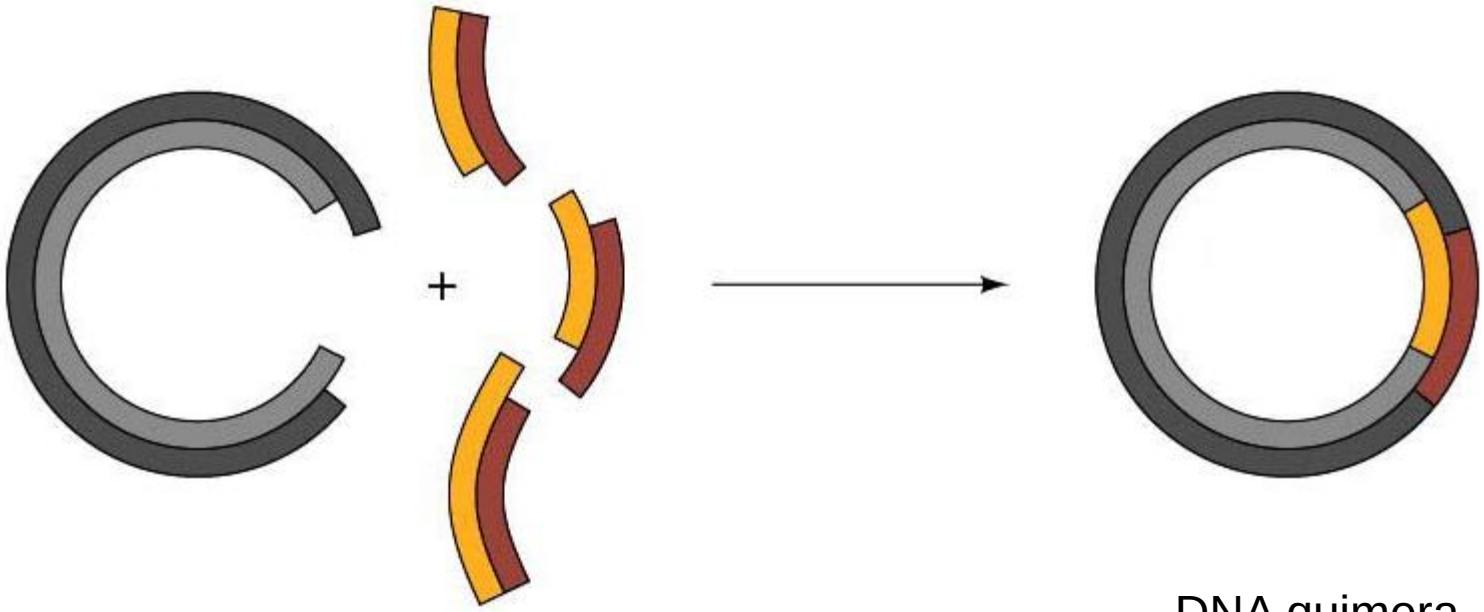


Hospedeiros: *E. coli*
levedura
células animais
células vegetais





Tecnologia do DNA recombinante: construção de uma molécula de DNA recombinante

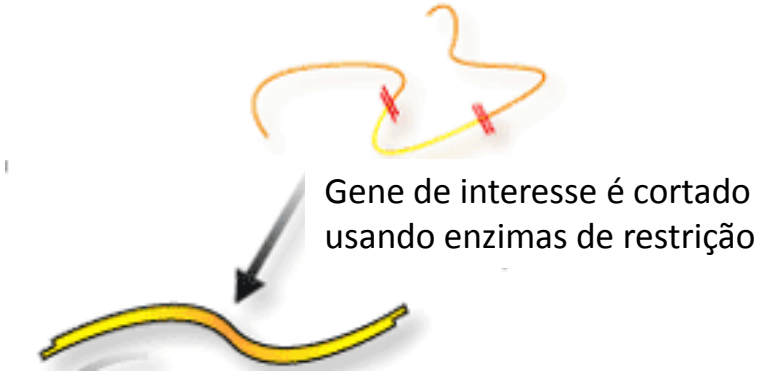


DNA quimera

Fragmentos de DNA ligados a um **vetor de clonagem** (**DNA recombinante**)

Vetores de clonagem - multiplicam moléculas de DNA recombinante (clones) em organismos vivos, gerando quantidades abundantes de clones

VETORES DE CLONAGEM



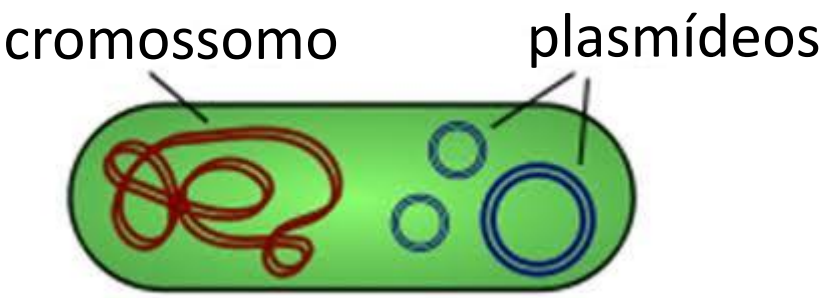
Inserto: fragmento do DNA alvo a ser usado para a construção da molécula de DNA recombinante

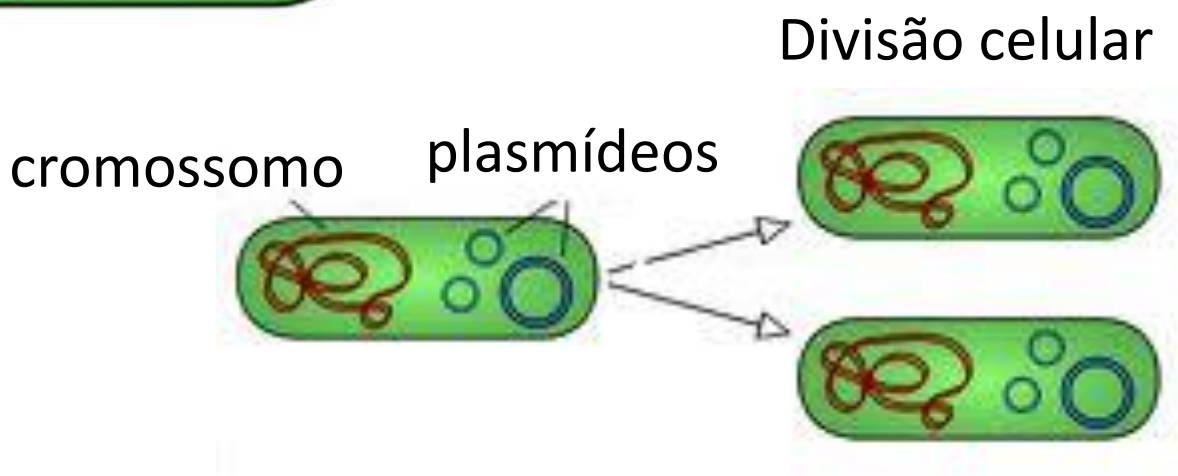
Quatro tipos de vetores para clonagem podem ser usados, dependendo do <u>tamanho do inserto</u>:

- 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)

PLASMÍDIOS E VETOR DE CLONAGEM





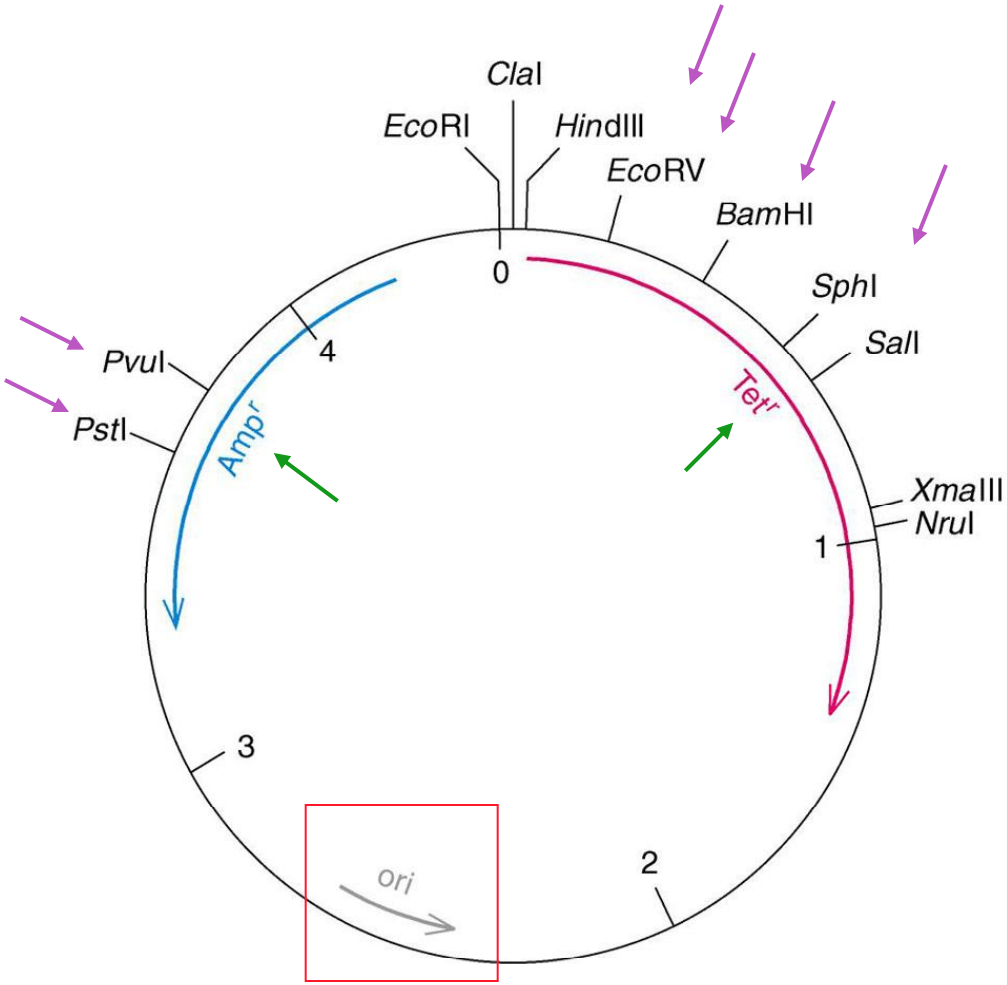
- ✓ ocorrem naturalmente em algumas bactérias;
- ✓ são moléculas de DNA dupla fita e circular;
- ✓ muitas vezes carregam genes para resistência a antibióticos;
- ✓ replicação independente da replicação cromossômica (apresentam uma origem de replicação independente).

PLASMÍDEOS COMO VETORES DE CLONAGEM

Plasmídeos podem ser modificados para carregar novos genes

- ✓ devem apresentar origem de replicação;
- ✓ devem apresentar um gene para seleção (gene para resistência a antibiótico);
- ✓ devem apresentar múltiplos sítios de clonagem (*poli-linker*)

VETORES DE CLONAGEM: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS



- Origem de replicação

↓

Permite a auto-replicação, independente do cromossomo

- Genes para resistência a antibióticos

↓

Permite que a célula hospedeira cresça em meio seletivo

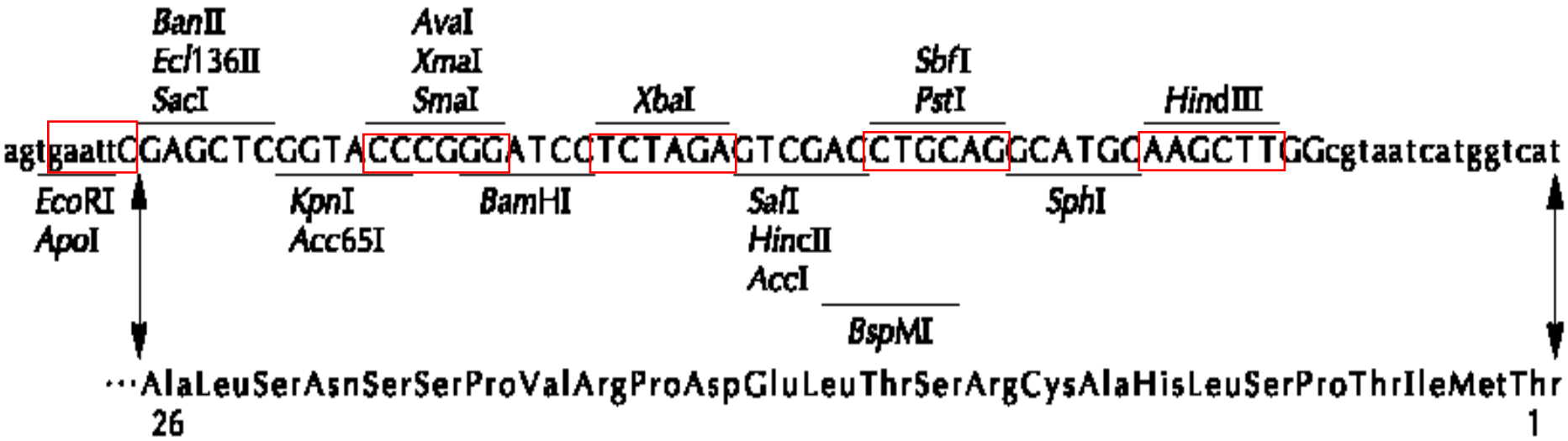
- Múltiplos sítios de clonagem

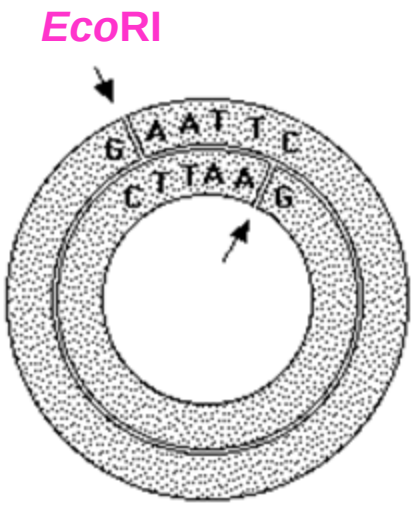
↓

Permite a inserção de DNA exógeno

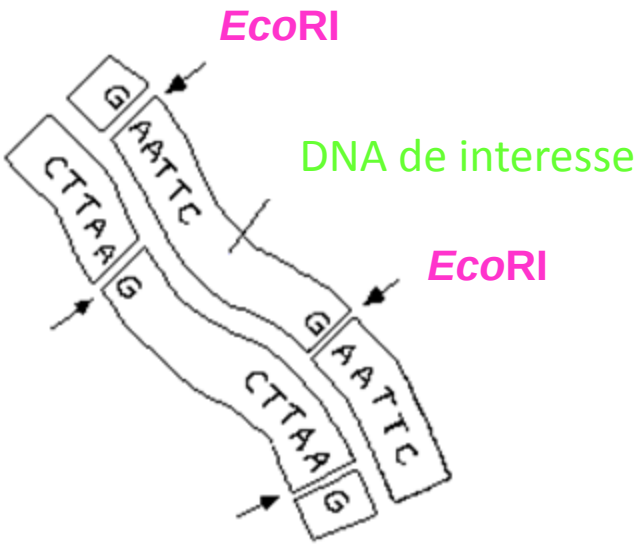
VETORES DE CLONAGEM

Poli-linker (sítio múltiplo de clonagem)



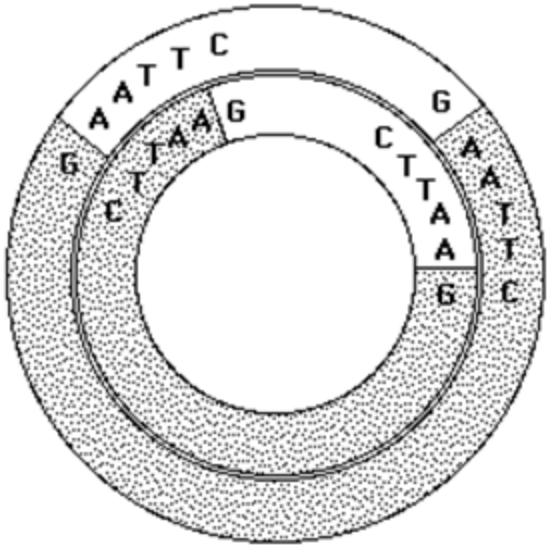


Plasmídeo

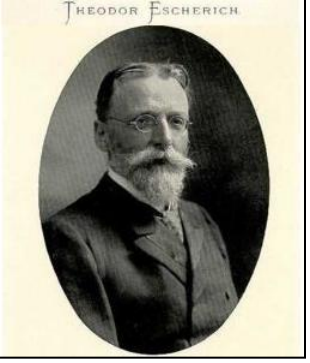


Extremidades coesivas

Ligação



DNA recombinante



Escherichia coli

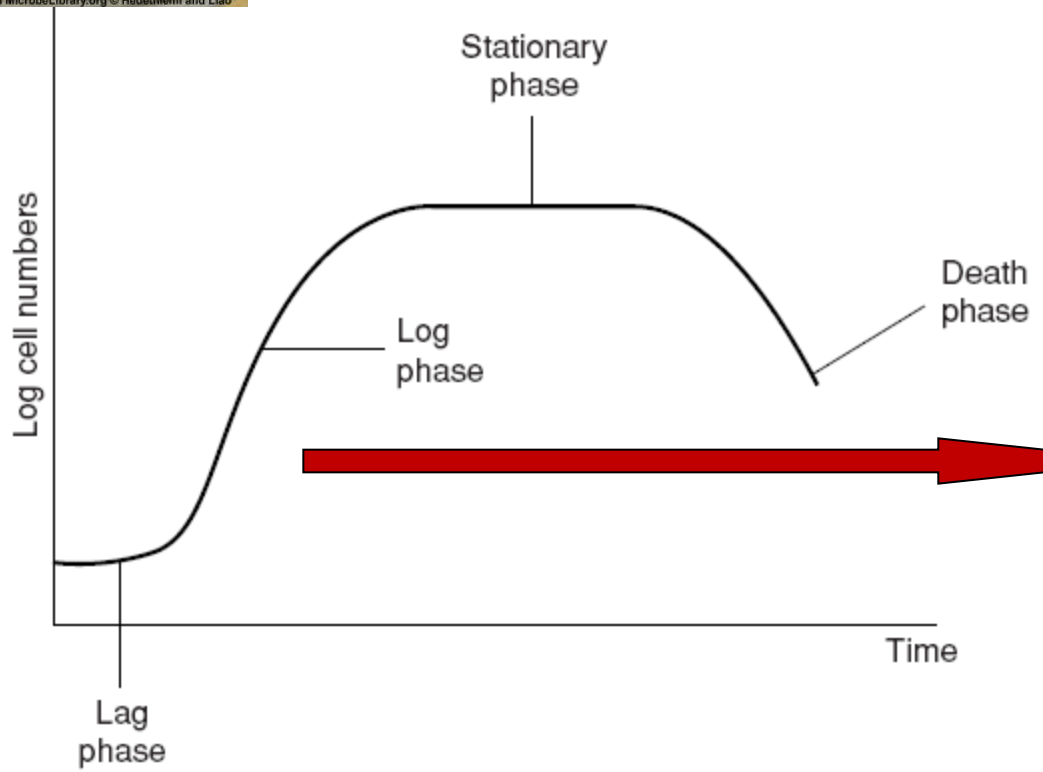
- Unicelular, na forma de bastão;
- Cresce rapidamente a 37ºC ;
  - ciclo de 20 min

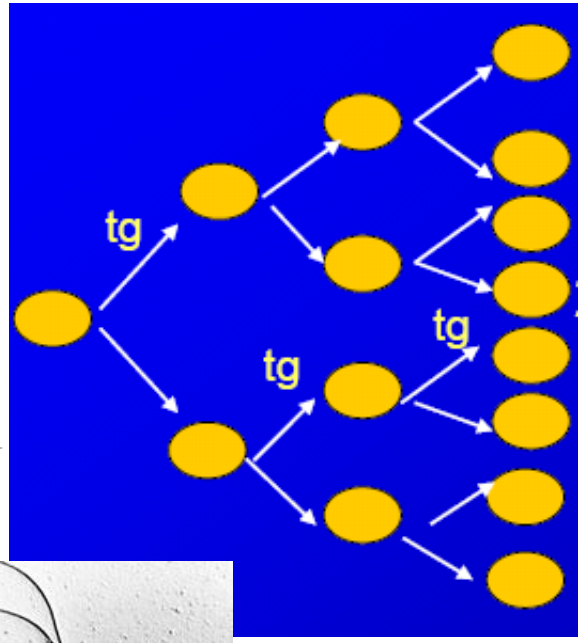
Uma geração: 20 minutos

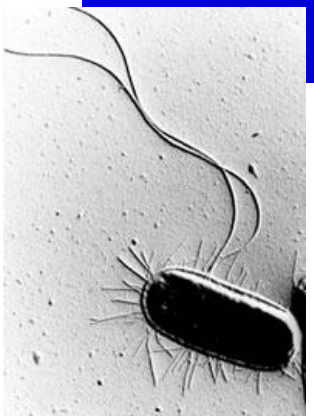
- Pouco exigente quanto a nutrição;
- Meio mínimo ou rico:
  - Glicose - melhor fonte de C
  - Extrato de levedura - vitaminas
  - Triptona e Peptona: fonte aminoácidos

PROGRESSÃO GEOMÉTRICA DO CRESCIMENTO POPULACIONAL BACTERIANO

Uma geração: 20 minutos







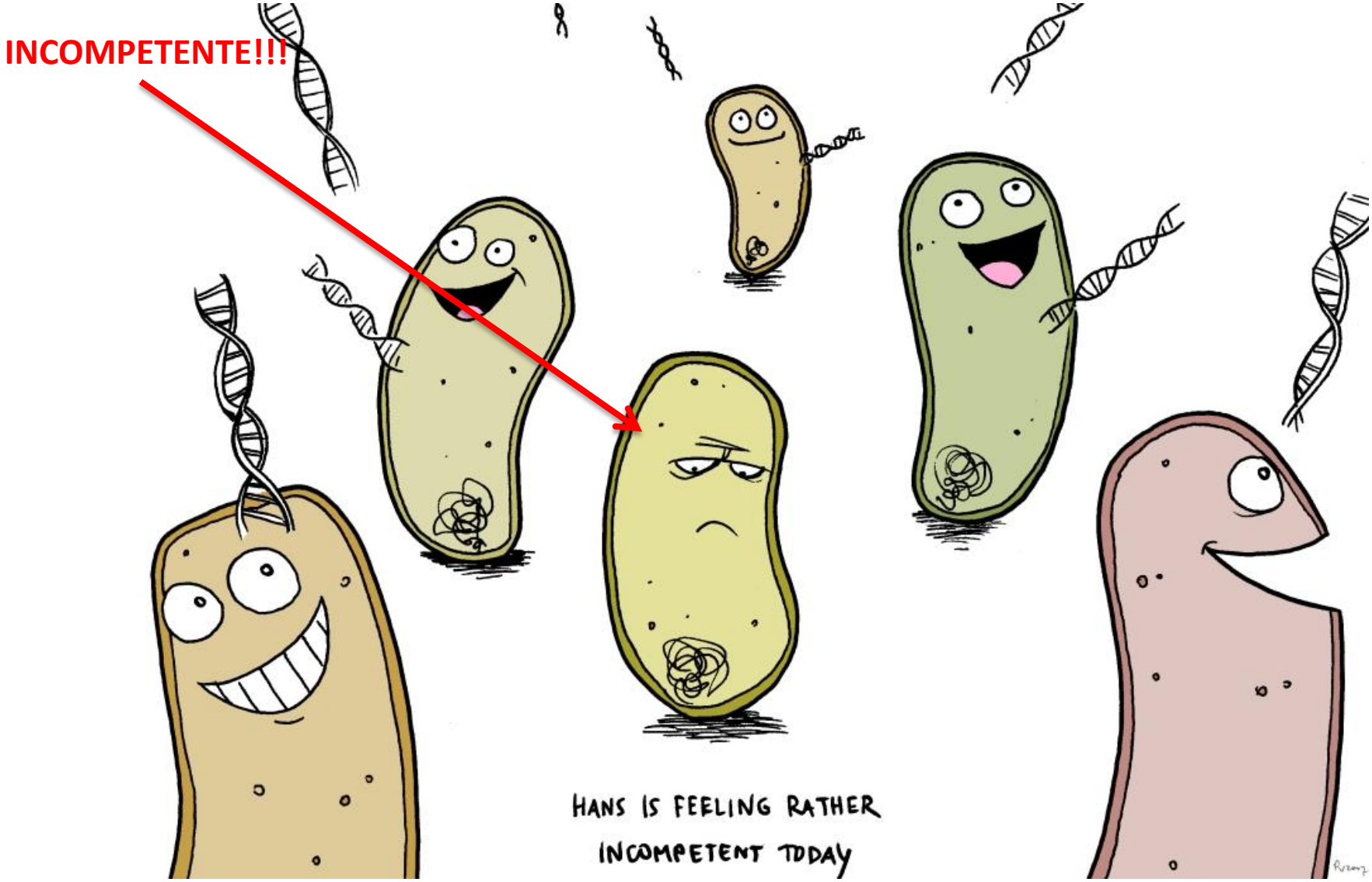
Curva de crescimento

BACTÉRIAS PARA TRANSFORMAÇÃO

- Não apresentam DNA plasmidial

- Precisam ser preparadas
  - Tornar-se <u>competentes</u> = aptas a receberem a molécula de DNA recombinante

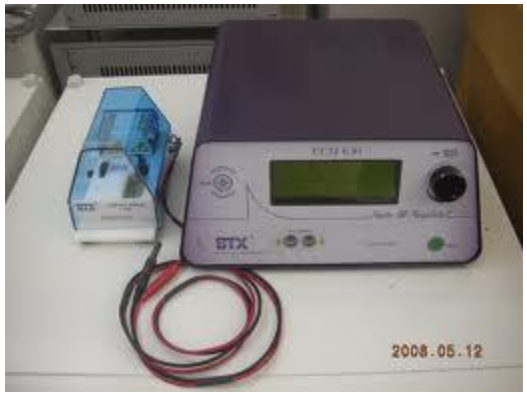
CÉLULAS COMPETENTES

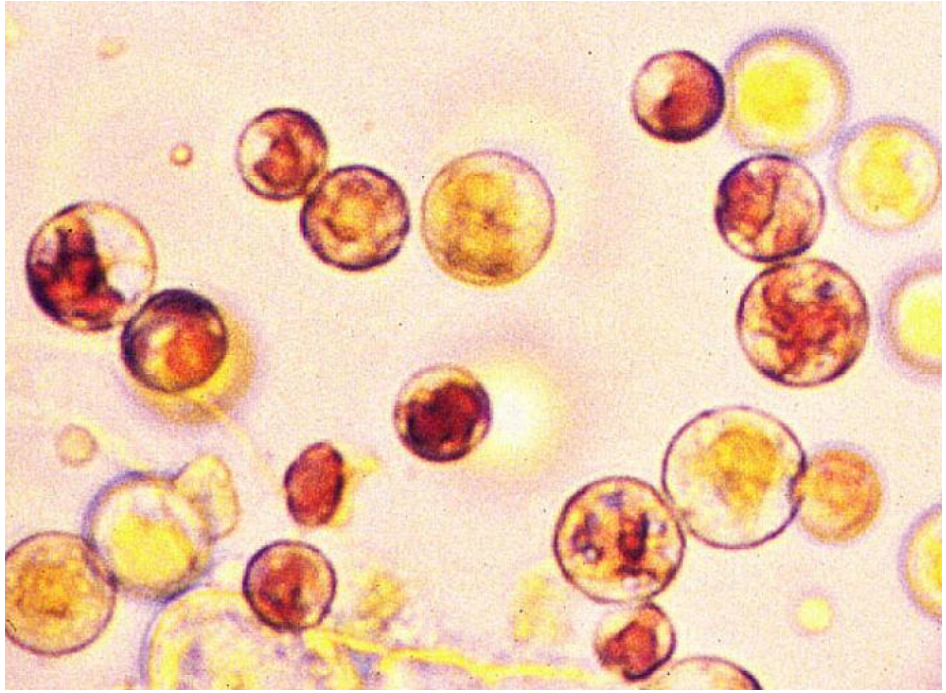


Uma bactéria diz-se **competente** quando tem a **capacidade de aceitar DNA estranho**.

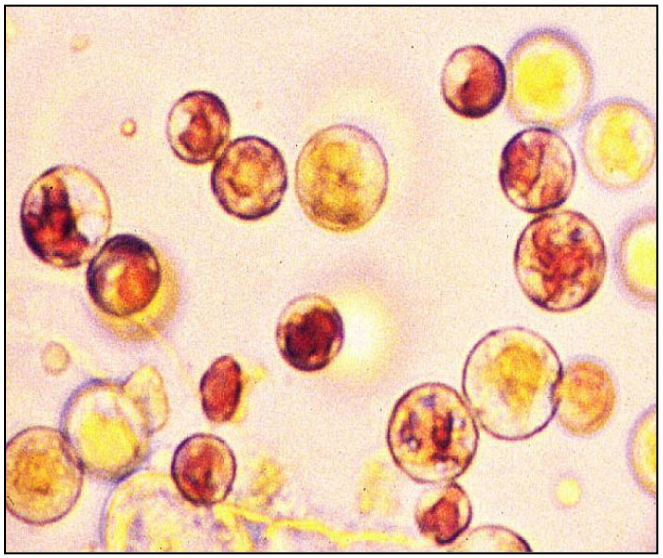
INSERÇÃO DO DNA DENTRO DA CÉLULA BACTERIANA – O HOSPEDEIRO

- Transformação química
- Eletroporação



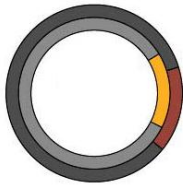


TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA



Suspensão de células competentes

+

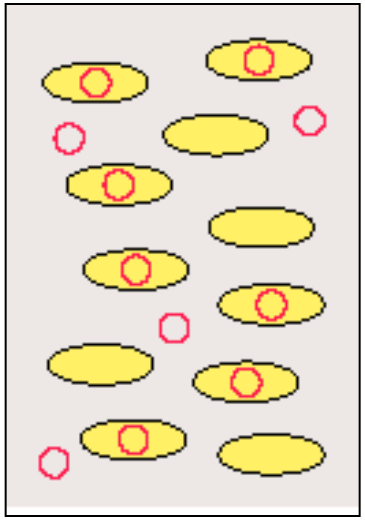


Moléculas de DNA recombinante

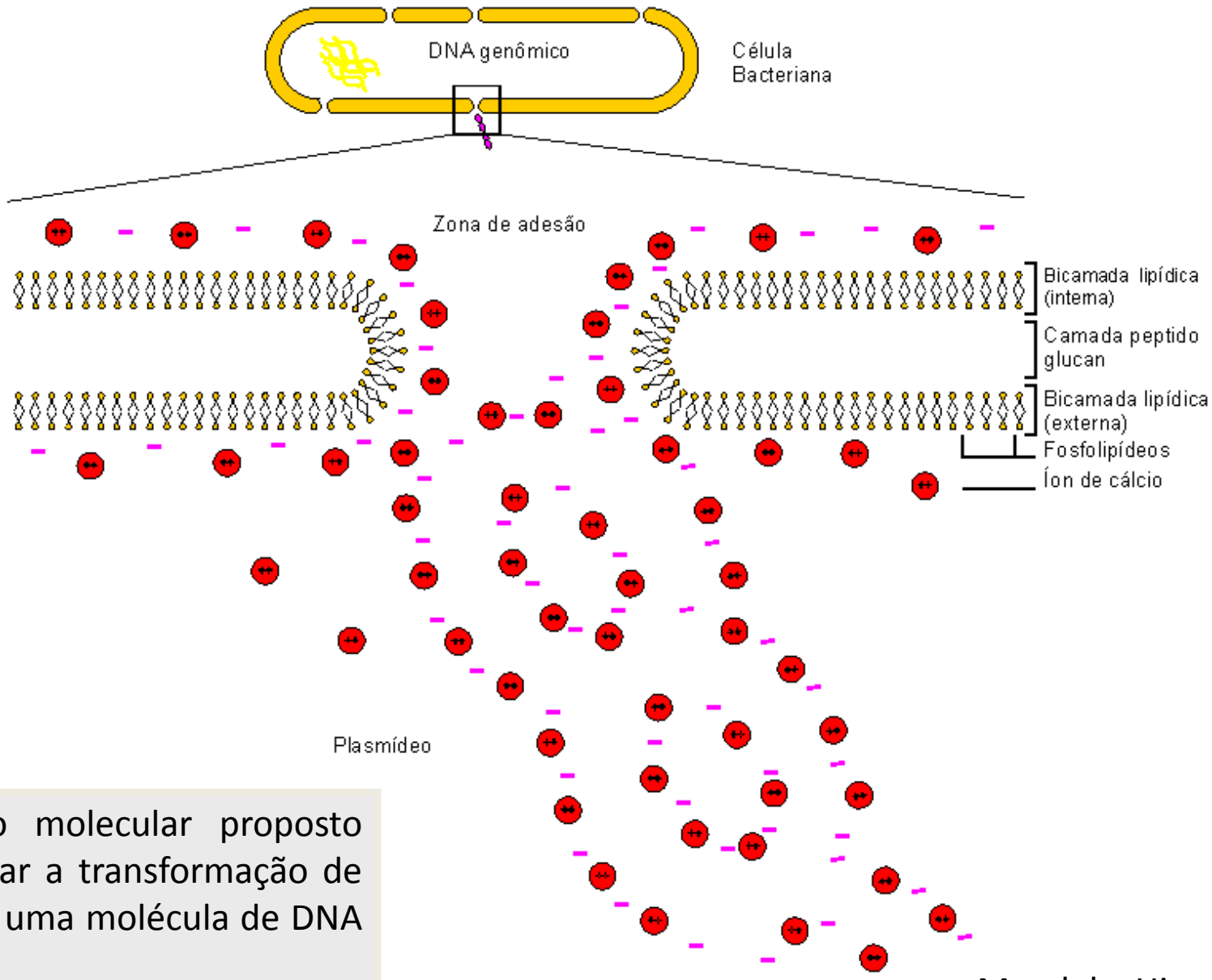
=

Incubar 30 min no gelo

Choque térmico (42°C/30 s)



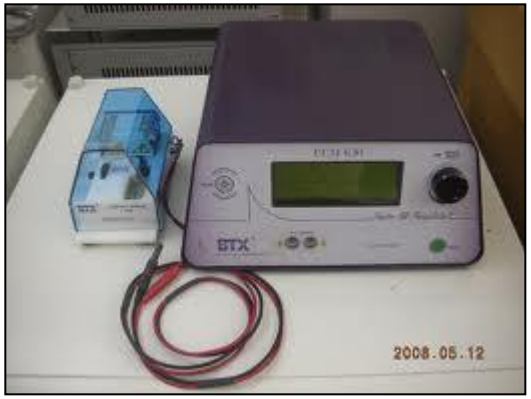
TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA



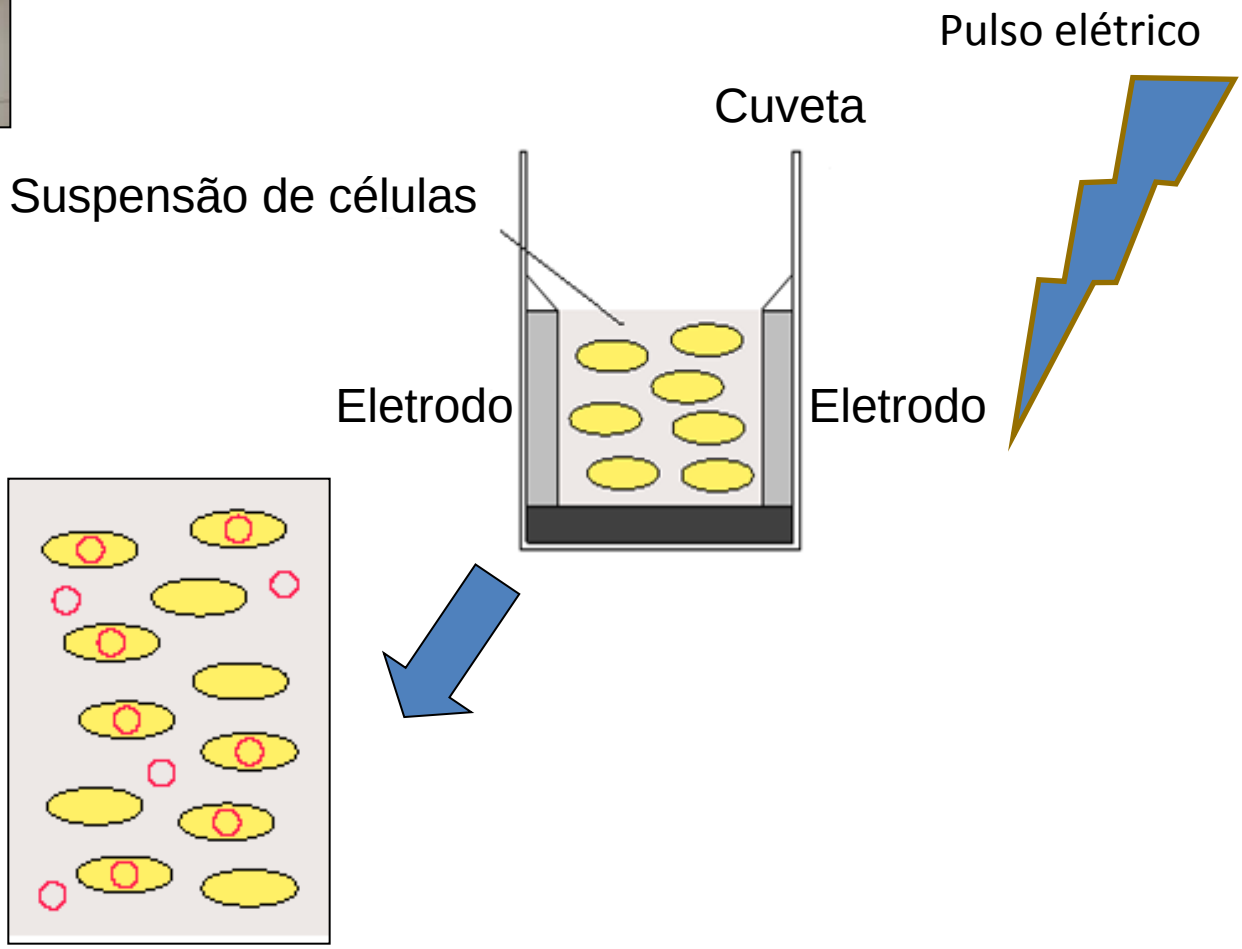
Mecanismo molecular proposto para explicar a transformação de *E. coli* com uma molécula de DNA exógeno.

Mandel e Higa, 1970

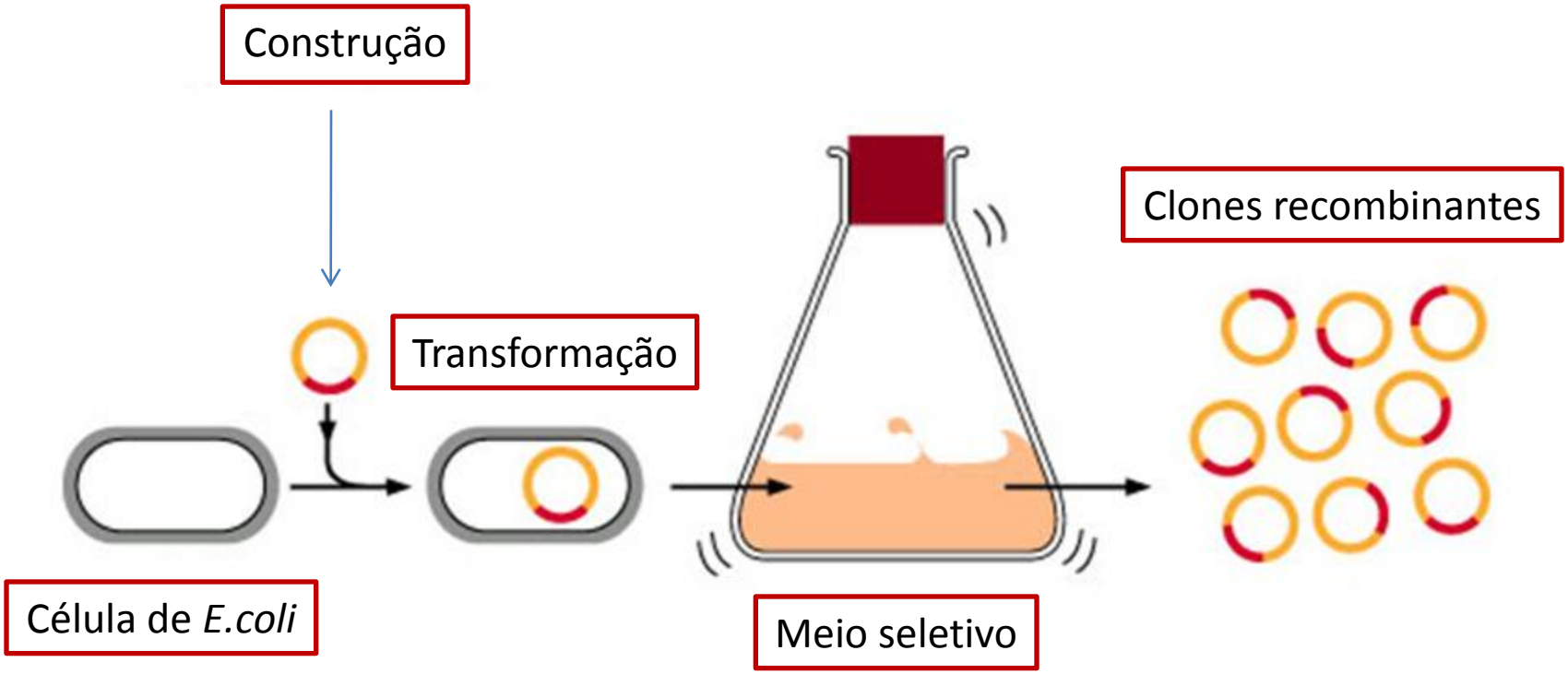
ELETROPORAÇÃO



Eletroporador



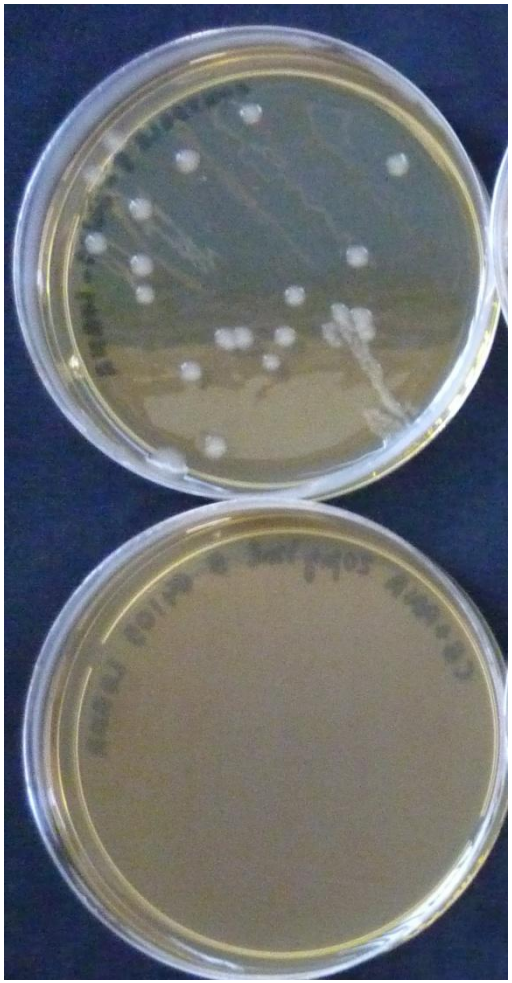
SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES



©1998 GARLAND PUBLISHING

Ex: Meio com antibiótico (ampicilina)

MC + ampicilina



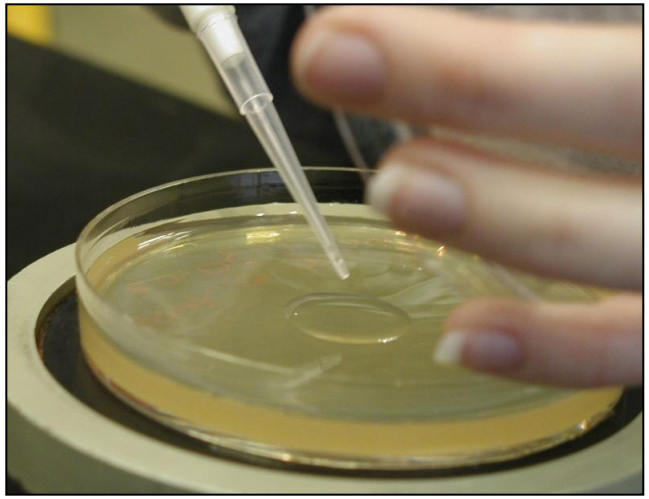
Células transformadas

Clones resistentes a ampicilina

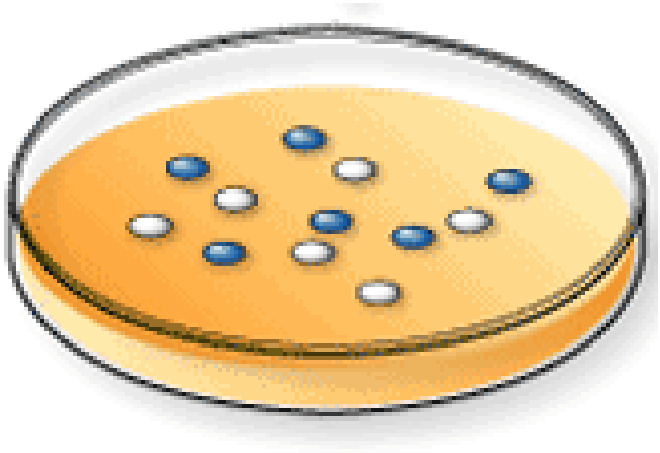
Células controle (não transformadas)

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 *lac*Z) 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:

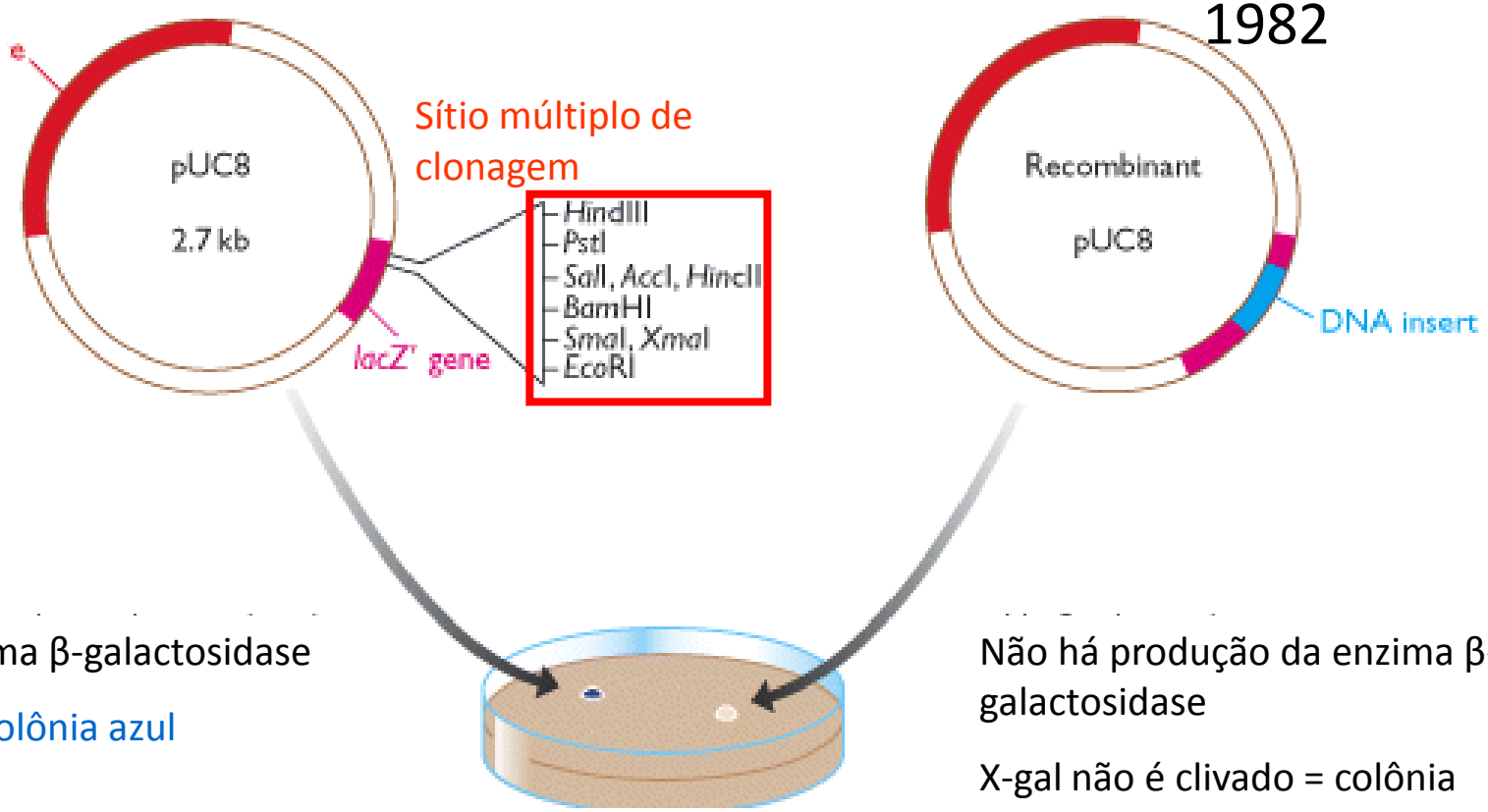
• colônias brancas (β-gal inativa) - positivas (com inserto)
• colônias azuis (β-gal ativa) - negativas (sem inserto)

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

pUC8

Vieira & Messing, 1982

Gene de resistência à ampicilina



Produção da enzima β-galactosidase

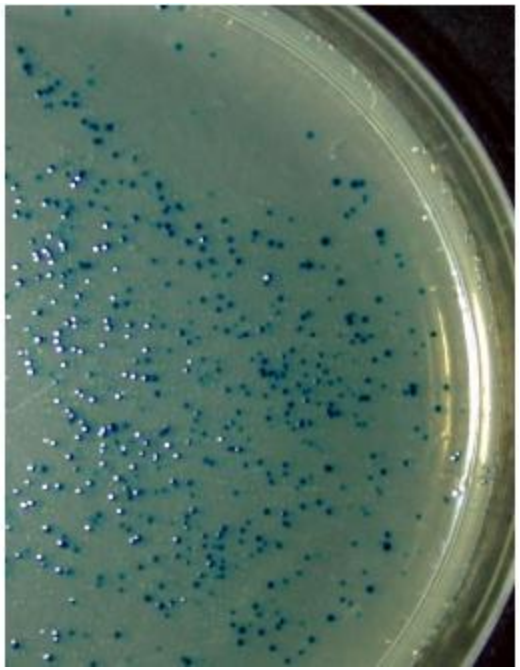
X-gal é clivado = colônia azul

Ágar + ampicilina + **X-gal**

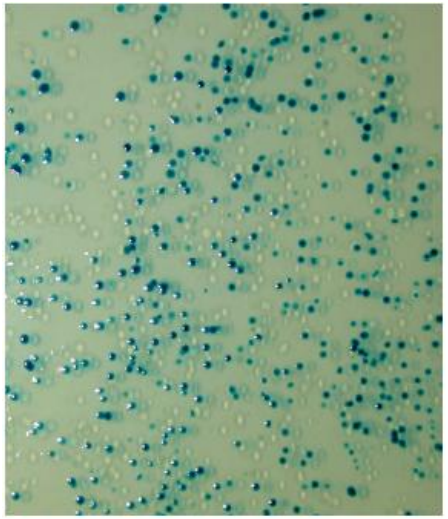
Não há produção da enzima β-galactosidase

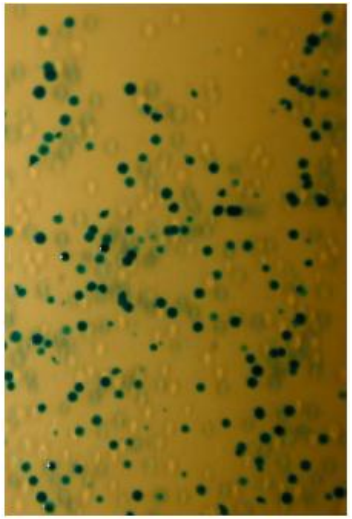
X-gal não é clivado = colônia branca

Gene *lac*Z = codifica a enzima β-galactosidase



Quais colônias nos interessam e por quê?

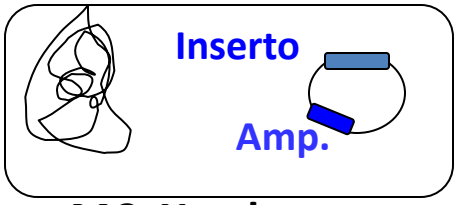




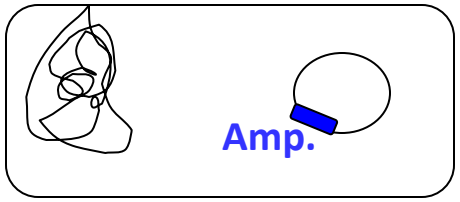
POSSÍVEIS RESULTADOS APÓS A ETAPA DE TRANSFORMAÇÃO

Célula bacteriana

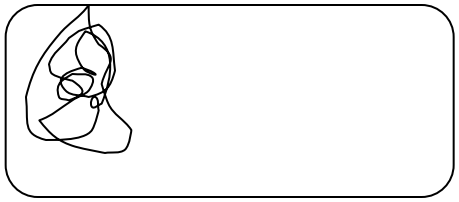
DNA cromossomal



MC+X-gal+amp

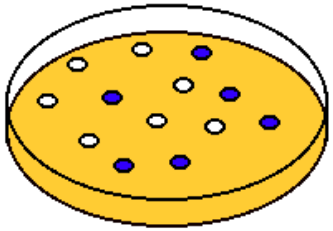


MC+X-gal+amp



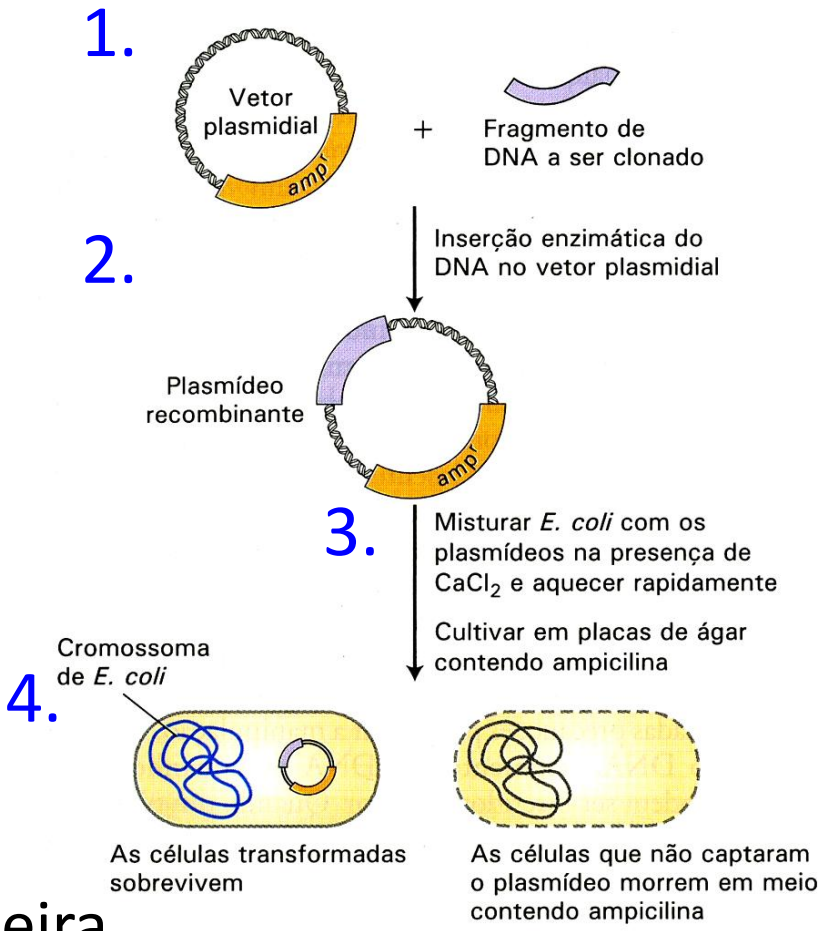
MC+X-gal+amp

Plasmídeo com inserto	**Plasmídeo sem inserto**	**Sem** plasmídeo
✓Resistência à ampicilina	✓Resistência à ampicilina	✓**Sem** resistência à ampicilina
✓*Lac*Z não funcional	✓*Lac*Z funcional	✓**Sem** gene *Lac*Z
✓**Colônias brancas**	✓**Colônias azuis**	✓**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

Animação: https://www.youtube.com/watch?v=PmM6jQ2wl5A

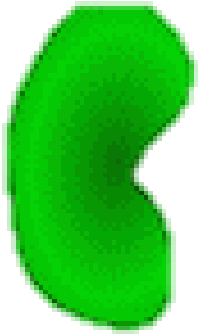
CLONAGEM INDEPENDENTE DE CÉLULAS VIVAS PCR

REAÇÃO DE PCR

DNA molde

H_2O + tampão

primers



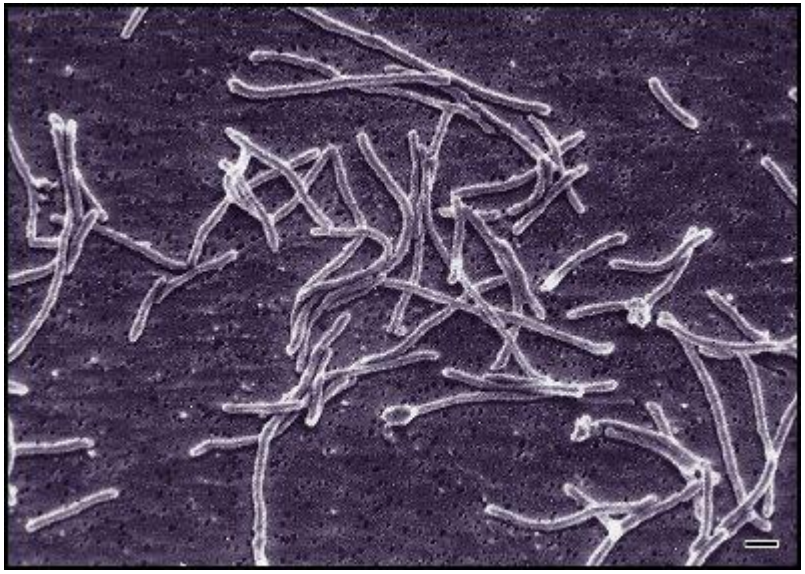
DNA polimerase

A T C G

nucleotídeos

Thermus aquaticus

Thermus aquaticus é uma espécie de bactéria que pode suportar temperaturas elevadas, uma de várias bactérias termófilas. Esta é a fonte da enzimas resistente ao calor como a Taq polimerase de DNA , um dos 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

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 $^{87}Sr/^{86}Sr$ 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 $^{87}Sr/^{86}Sr$ 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 $^{87}Sr/^{86}Sr$ 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.

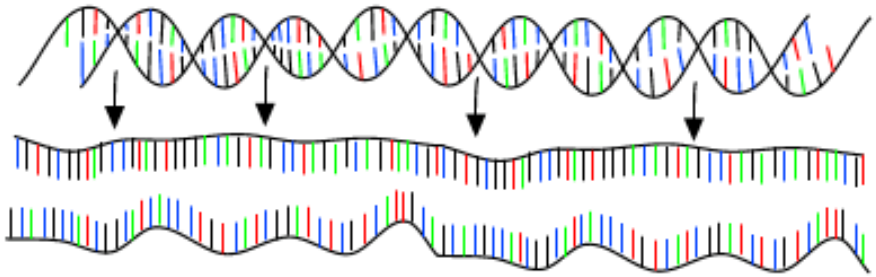
28 September 1987; accepted 7 December 1987

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

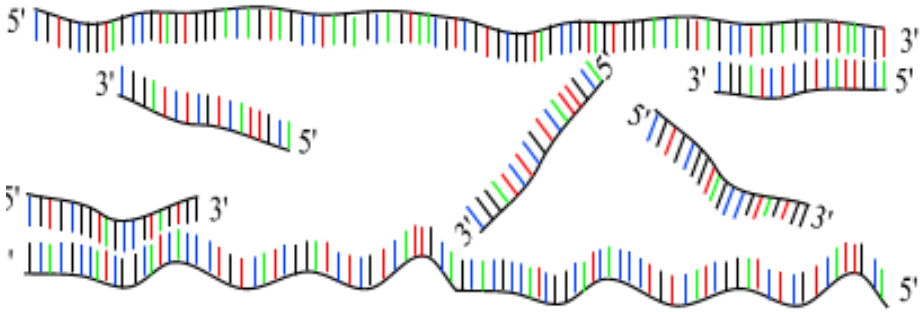
RANDALL K. SAIKI, DAVID H. GELFAND, SUSANNE STOFFEL, STEPHEN J. SCHARF, RUSSELL HIGUCHI, GLENN T. HORN, KARY B. MULLIS,* HENRY A. ERLICH

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.

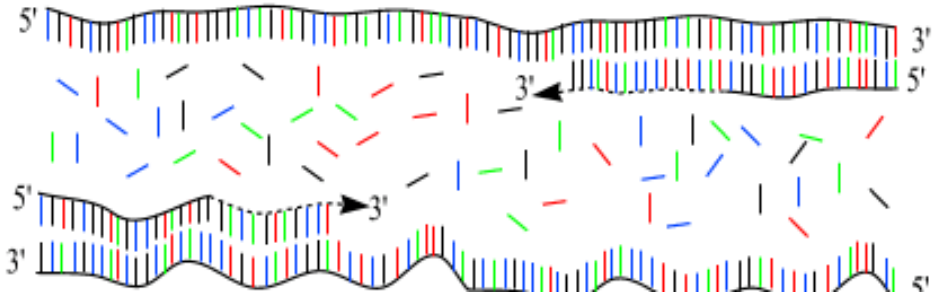
Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." Science 239 (1988): 487-491.



Step 1 – desnaturação
1 minuto – 94ºC

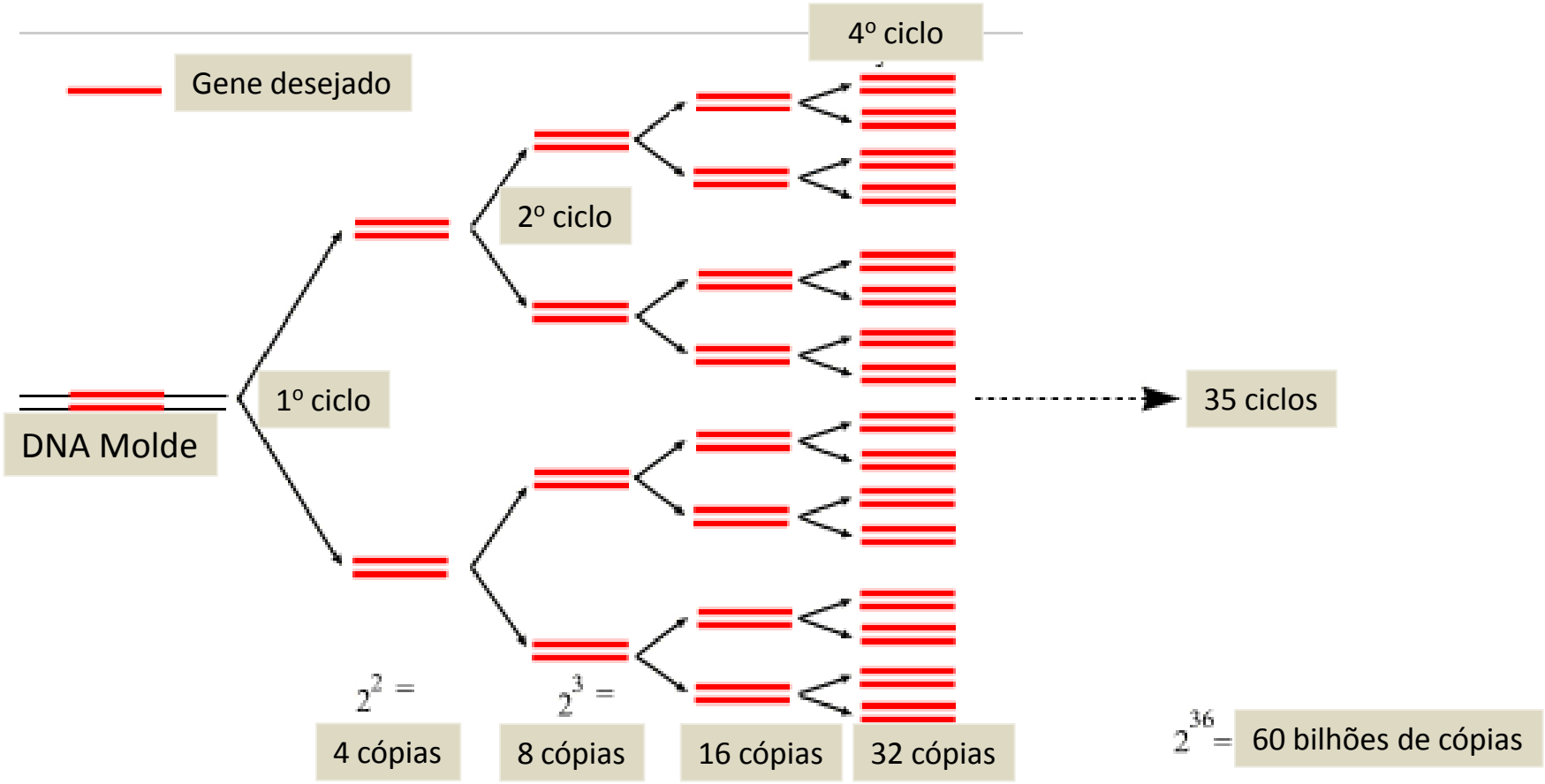


Step 2 – anelamento
45 segundos– 55ºC



Step 3 – extensão
45 segundos– 72ºC

A AMPLIFICAÇÃO É EXPONENCIAL!!



TERMOCICLADOR

Por que clonar genes???

Para o sequenciamento do DNA

Separar fragmentos de DNA em clones independentes

Estudar a transcrição e tradução de genes

Estudar a expressão funcional de genes

Sintetizar de proteínas para produção de anticorpos

Sintetizar proteínas para uso terapêutico

Produção de vacinas recombinantes

Etc..etc..etc...

International Rice Research Institute (IRRI)

The Golden Rice Story

- Deficiência em vitamina A é um problema importante de saúde pública

- Causa cegueira
- Influencia na severidade de diarréias e sarampo

- >100 milhões de crianças tem este problema

- Para muitos países a infra-estrutura não existe para entregar pílulas de vitaminas

- Melhorar o conteúdo de vitamina A em cereais parece uma alternativa atrativa

Via do β-Caroteno em Plantas

isopentenyl diphosphate

↓

Geranylgeranyl diphosphate

↓ Phytoene synthase

Phytoene

Problema:
Arroz faltam
estas enzimas

↓ Phytoene desaturase

↓ ξ-carotene desaturase

Lycopene

↓ Lycopene-beta-cyclase

β -carotene
(precursor de vitamina A)

Normal
Vitamin A
"Deficiente"
arroz

The Golden Rice Solution

Adicionar os genes da via do β-Caroteno

IPP

↓

Geranylgeranyl diphosphate

↓ Phytoene synthase (Daffodil gene)

Phytoene

↓ Phytoene desaturase

↓ ξ-carotene desaturase

Lycopene

↓ Lycopene-beta-cyclase (Daffodil gene)

β -carotene
(precursor de vitamina A)

1Gene de bactéria;
Realiza as duas funções

via
Vitamina A
está completo
e funcional

Golden
Rice

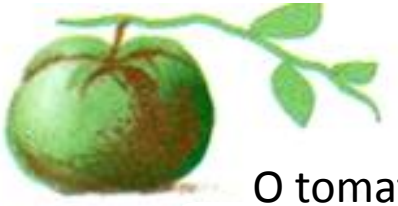
Flavr Savr (Calgene)

✓ O tomate Flavr Savr, foi desenvolvido pela Calgene, uma companhia de biotecnologia com base em Davis, na Califórnia. Vários anos se passaram até que o FDA aprovasse o transgênico. O FDA não exige aprovação, no entanto a Calgene submeteu voluntariamente o Flavr Savr para aprovação em 1989. Em 1994, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos aprovou que este não apresentava risco ao ambiente.

Flavr Savr (Calgene)

Tomate transgênico

Tomate tradicional

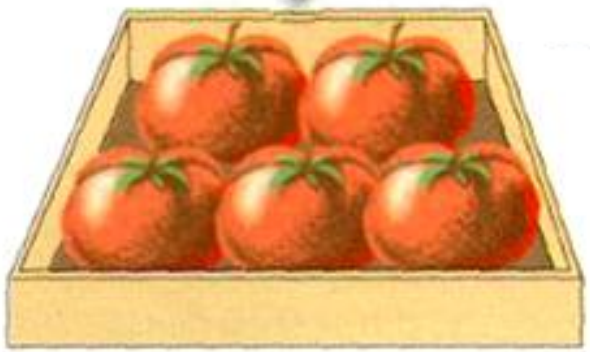


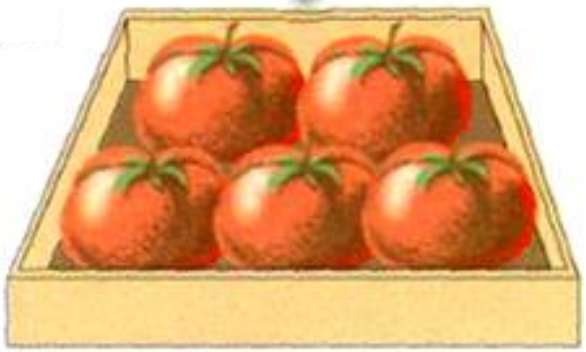
O tomate transgênico amadurece na planta, ficando com mais sabor. Mantém-se firme após a colheita.

O tomate tradicional é vaporizado com etileno para induzir a maturação.

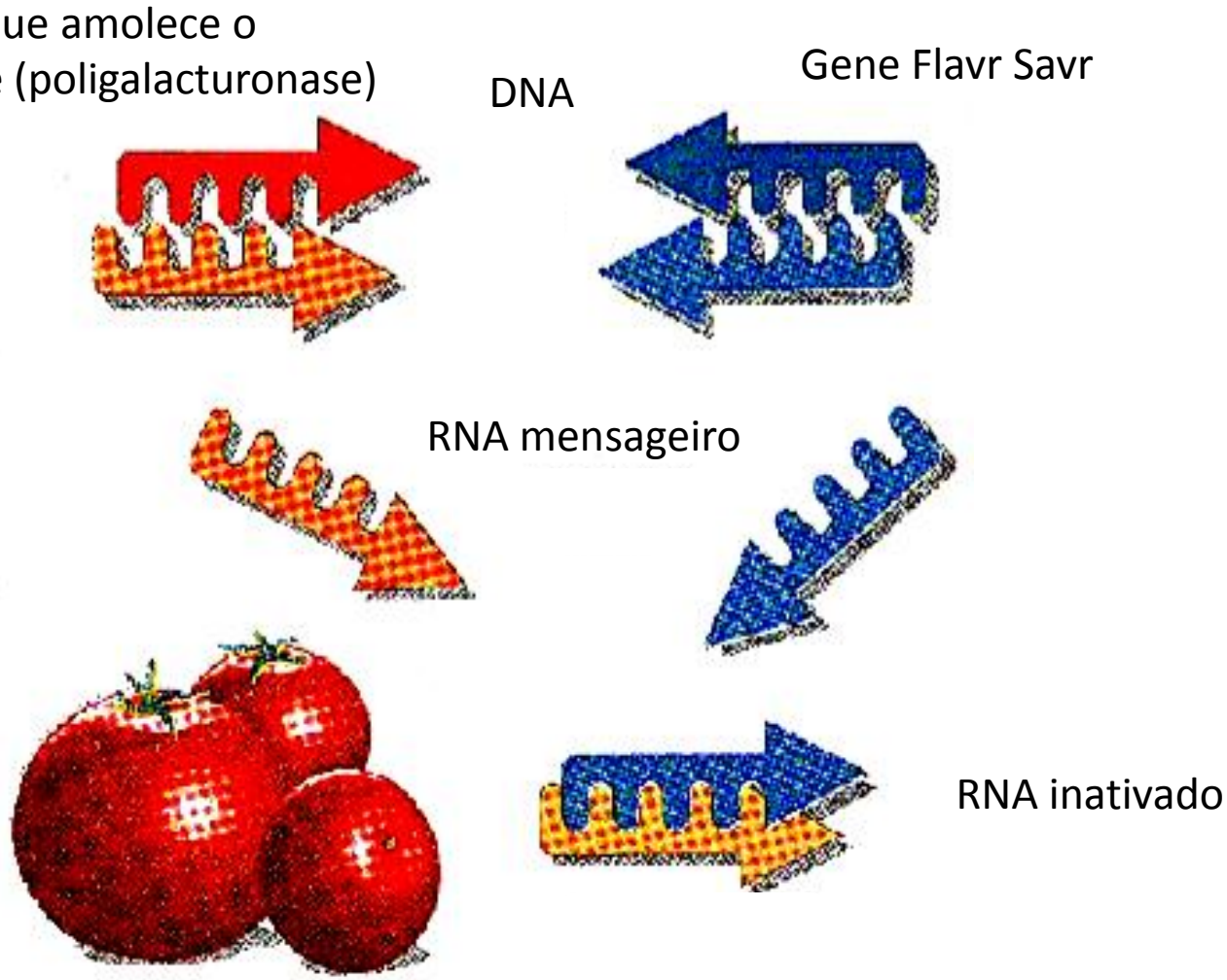
O tomate tradicional tem de ser colhido verde, para não ser esmagado durante o transporte.

SUPERMERCADO



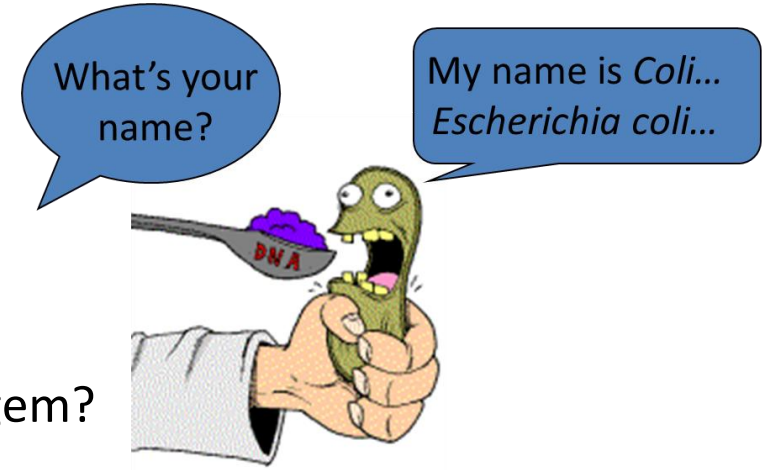


Flavr Savr


Gene que amolece o tomate (poligalacturonase)
DNA
Gene Flavr Savr
RNA mensageiro
RNA inativado

ESTUDO DIRIGIDO

1. Principio da Tecnologia do DNA recombinante
2. Enzimas de restrição
3. Eletroforese
4. O que é um vetor de clonagem?
5. Quais as características de um vetor de clonagem?
6. Qual a diferença entre plasmídeo e vetor de clonagem?
7. O que é transformação bacteriana? Qual o princípio? Quais as aplicações?
8. Como se faz a seleção de uma bactéria transformada?
9. O que é a PCR?



Aula cedida, com modificações:
Profa. Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética