

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE: HISTÓRICO, ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E VETORES



Aula 3

LGN0232 – Genética Molecular

Thalita Peixoto Basso
Departamento de Genética
tpbasso@usp.br

Módulo 1: → Histórico

Módulo 2: → Eletroforese em gel

Módulo 3: → Enzimas de restrição

Módulo 4: → Vetores

Questionário *e-disciplinas*

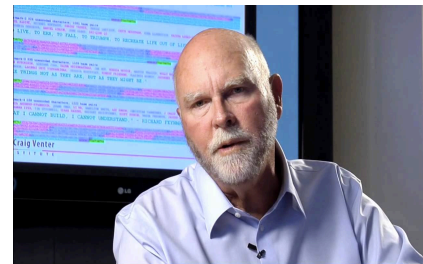
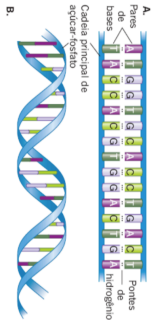
HISTÓRICO

Três grandes marcos da genética:

- ① Pesquisa de Gregor Mendel: descobre as regras que governam a herança de características nos organismos
- ② Elucidação da estrutura do DNA por J. Watson e F. Crick: identificação do material responsável pela herança hereditária
- ③ Projeto Genoma Humano: análise abrangente do material hereditário em seres humanos e outros organismos

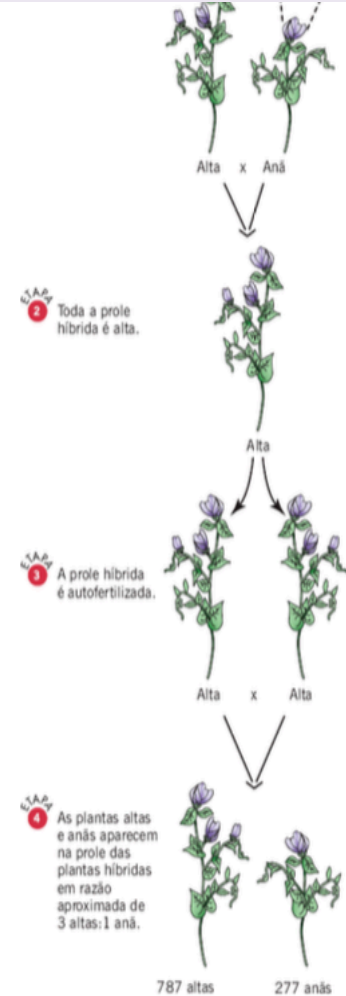
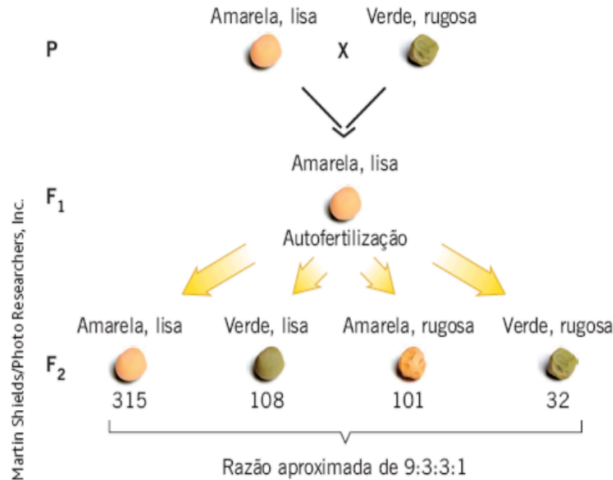


Amarela, lisa x Verde, rugosa



Mendel

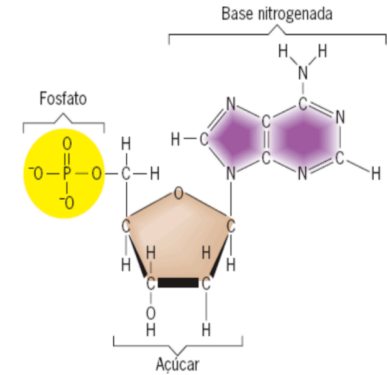
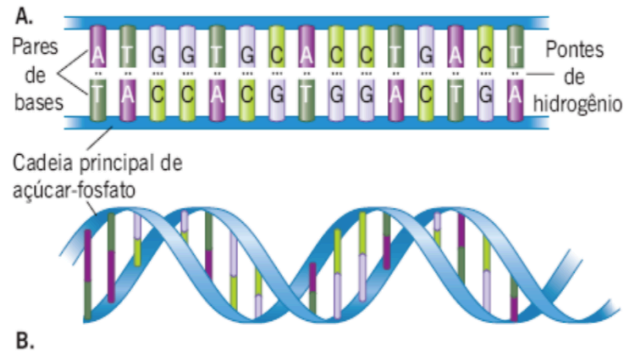
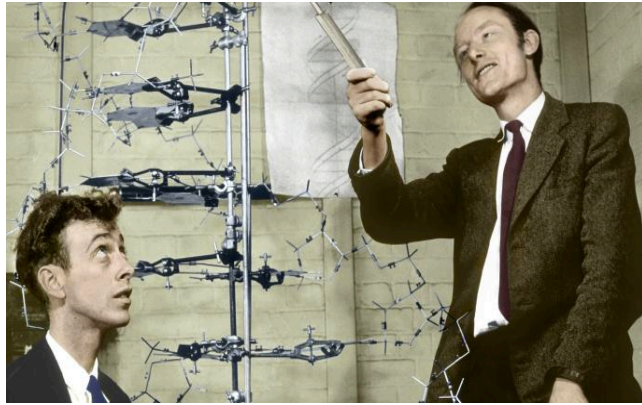
Os genes e as regras da herança



Século 19

- Estudou a herança de diferentes características em ervilhas
- Cruzamento entre plantas com características diferentes com o objetivo de observar a herança das características da prole
- Existência de fatores hereditários (**genes**) responsáveis pelas características

Watson e Crick - A estrutura do DNA

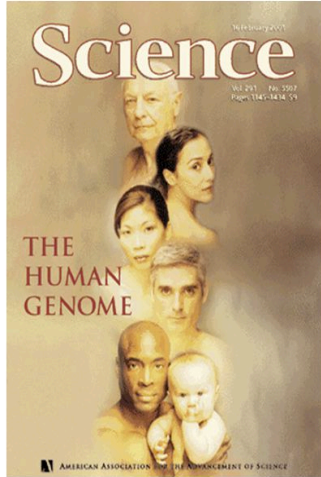


Século 20

- Demonstraram que os genes eram constituídos de nucleotídeos
- 1953: deduziram o modo de organização dos nucleotídeos no DNA
- Nucleotídeos estão unidos um ao outro em uma cadeia
- As ligações são formadas por interações químicas entre o fosfato de um nucleotídeo e o açúcar de outro nucleotídeo, formando uma cadeia principal de açúcar-fosfato, a qual estão fixadas as bases nitrogenadas
- A sequência de bases é que distingue um gene do outro
- Propuseram que as moléculas de DNA eram constituídas de duas cadeias de nucleotídeos, unidas por ligações de hidrogênio

Projeto Genoma Humano

Sequenciamento do DNA e catalogação dos genes



Genoma: coleção de moléculas de DNA características de um organismo

Sequenciamento do genoma: sequenciamento de todos os genes do organismo
Colaboração de pesquisadores de diferente países, além de Graig Venter (cientista e empresário)

2001: publicação de dois artigos sobre genoma humano. Sequenciamento de 2,7 bilhões de pares de nucleotídeos de DNA humano. Análises recentes apontam que o genoma humano contenha 20.000 genes, catalogados por localização, estrutura e possível função. Os esforços agora se concentram em estudar como os genes influenciam as características dos seres humanos, e quanta variância genética existe na espécie humana



Os genomas de muitos outros microrganismo (bactérias, fungos, vegetais, protistas e animais) também foram sequenciados. A princípio, as tentativas de sequenciamento concentram-se em microrganismos favoráveis à pesquisa genética, como os organismos-modelo (*E.coli*, *S.cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*) para ampliar o conhecimento genético.

Análise genética

Genética Clássica

Genética Molecular

Genética de Populações

Gene

Molécula de DNA

População de organismos

Estudo herança características

Sequenciar moléculas de DNA

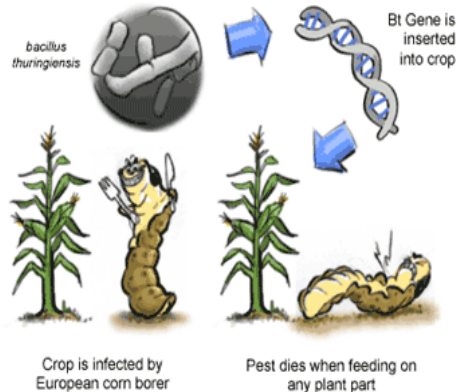
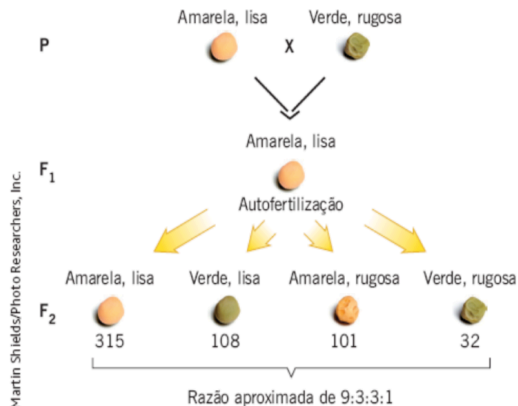
Alelos diferentes de um gene

Resultados de intercruzamentos

Manipulação do DNA

Geneticamente distintos

Tecnologia DNA recombinante

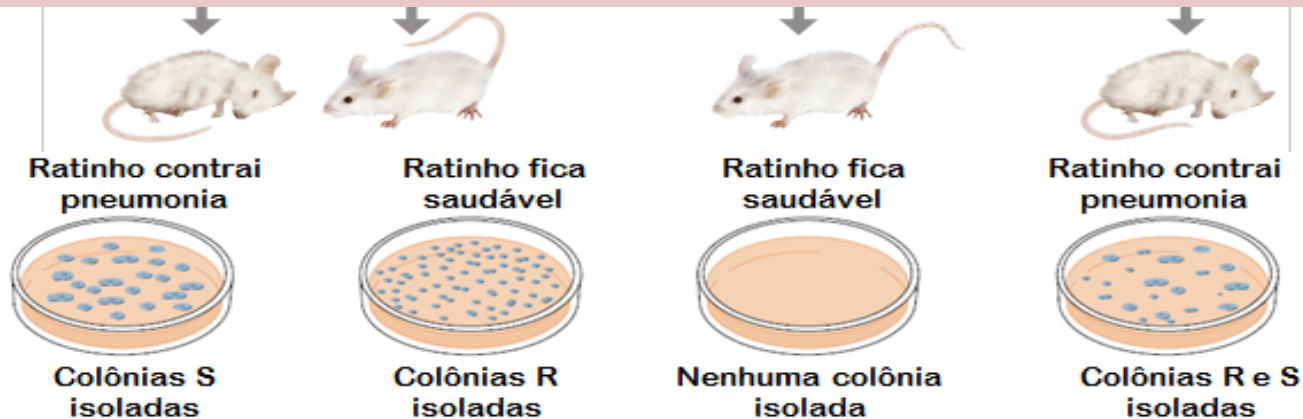


Há algum material nas células de bactérias, mesmo mortas, que possa transformar células vivas de outras bactérias?



CONCLUSÃO

Havia alguma substância nas células das bactérias patogênicas (cepa S) mortas, que podia **transformar** as células vivas das bactérias não-patogênicas (cepa R)



PRINCÍPIO TRANSFORMANTE

Qual o material presente nas células que é capaz de transformar outras células? Proteínas, RNA ou DNA?



Oswald Avery

Bactéria patogênica (cepa S)

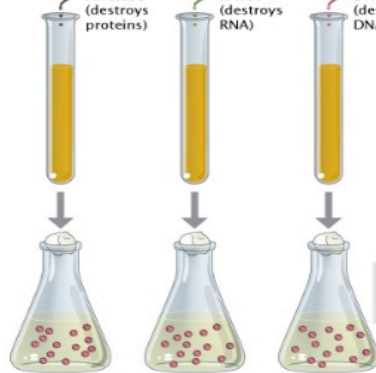


Morte por aquecimento das bactérias patogênicas

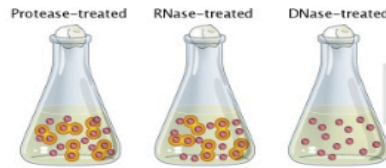


Extrato líquido a partir da bactéria patogênica (cepa S) morta

Tratamento enzimático



Extrato tratado adicionado das bactérias não-patogênicas (cepa R)



Transformação:

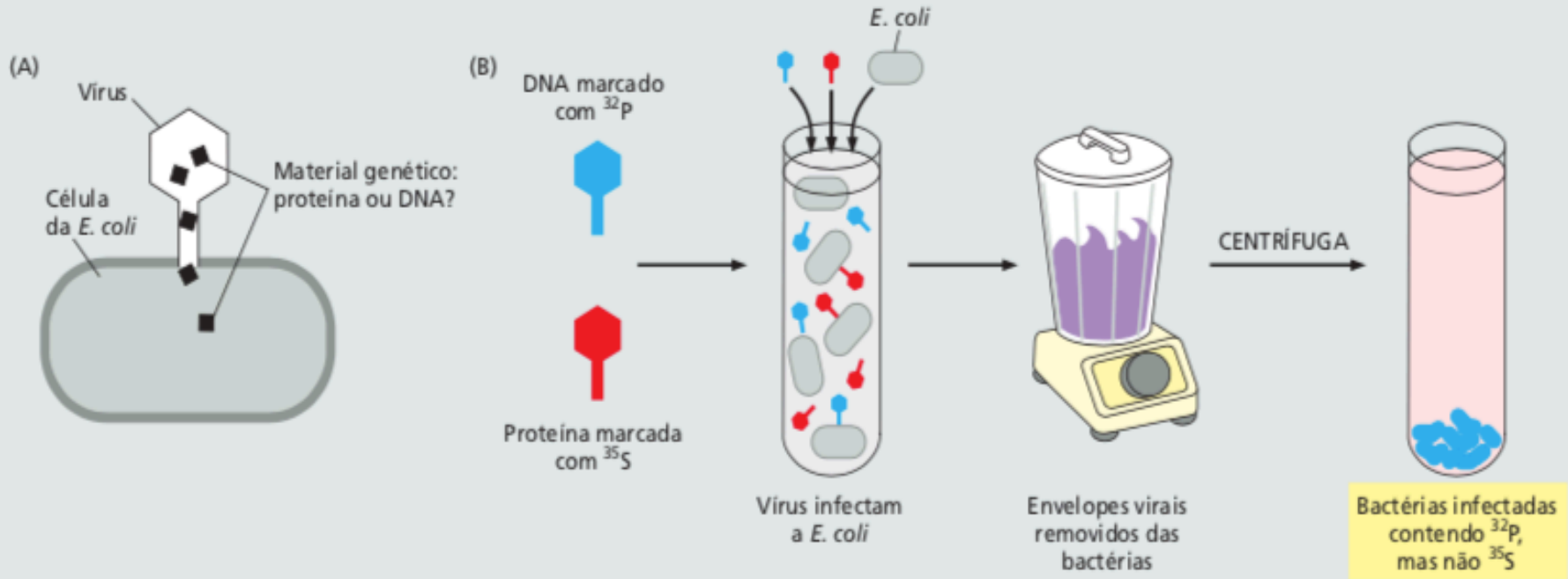
- ✓ Ocorreu nos tratamentos com proteinases e RNase
- ✓ Não ocorreu no tratamento com DNase

Transformação ocorreu:
novas células patogênicas surgiram, presença de cepas S e R

Transformação NÃO ocorreu: apenas células bacterianas não-patogênicas presentes (cepa R)

CONCLUSÃO
DNA é a molécula responsável pela transformação

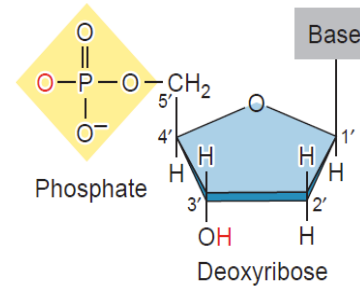
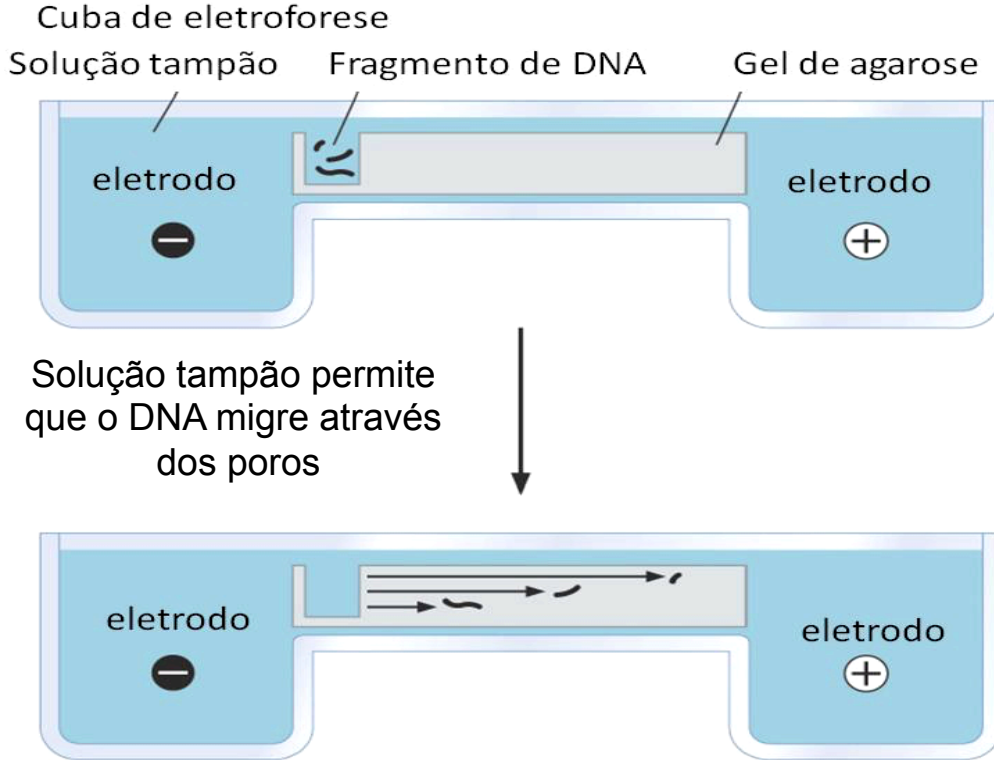
Como o bacteriófago infecta a bactéria? Qual estrutura responsável pela multiplicação do fago?



Hershey e Chase demonstraram definitivamente que os genes são compostos por DNA

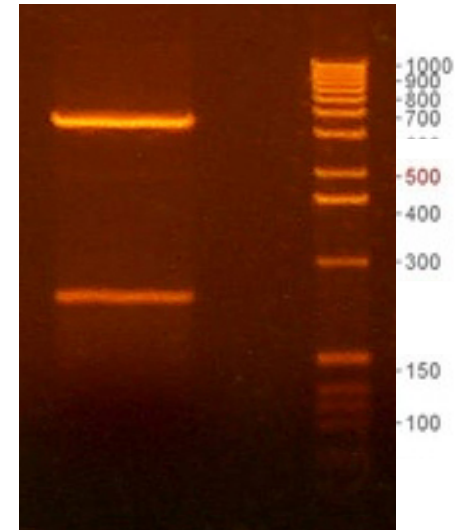
ÁCIDOS NUCLÉICOS: MÉTODOS BÁSICOS

A eletroforese em gel separa as moléculas de DNA de acordo com o seu tamanho



(a) Repeating unit of deoxyribonucleic acid (DNA)

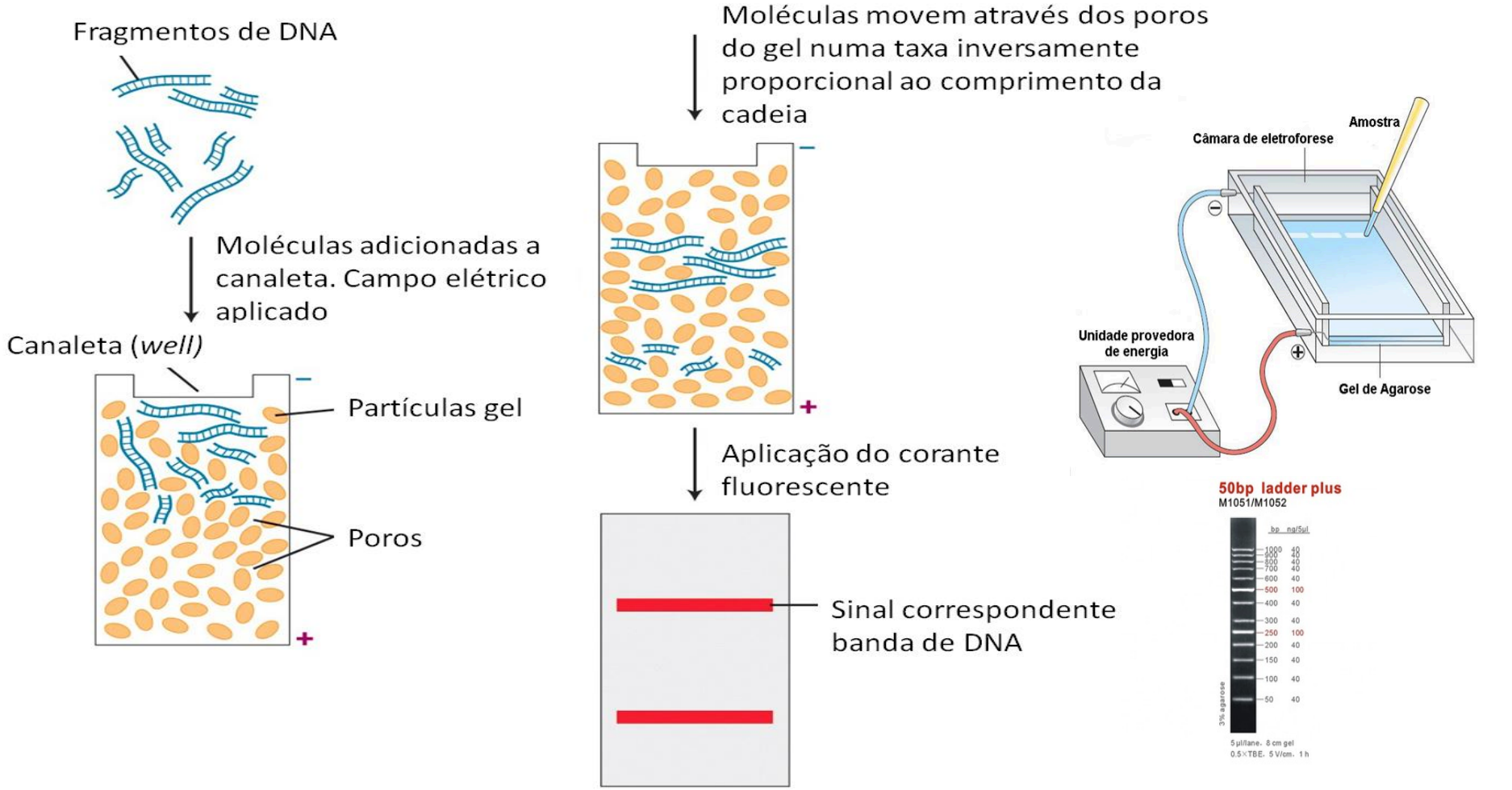
Marcador de peso molecular



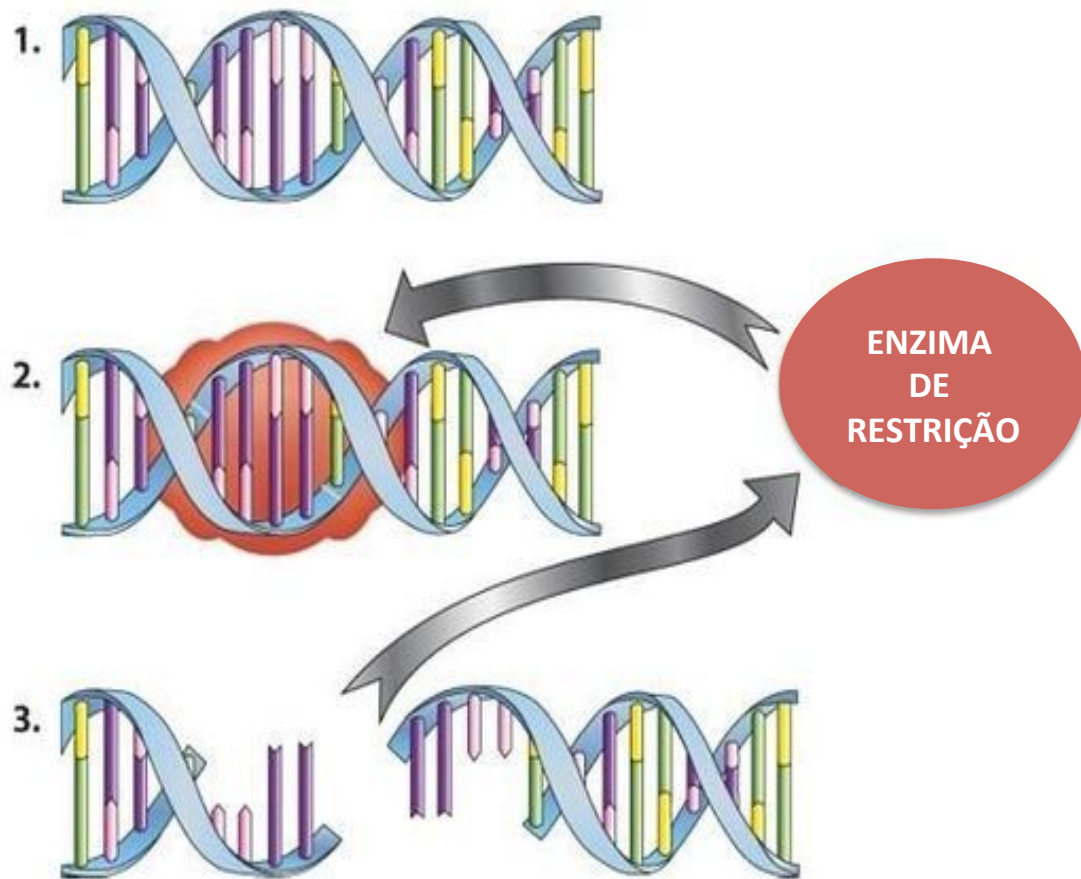
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

Os fragmentos de DNA menores deslocam-se mais rápido ao longo do gel do que os fragmentos maiores

A eletroforese em gel separa as moléculas de DNA de acordo com o seu tamanho



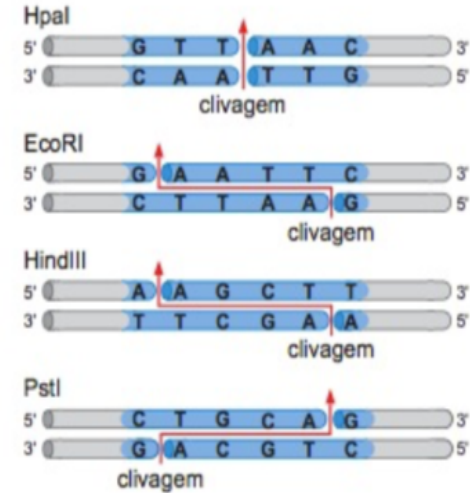
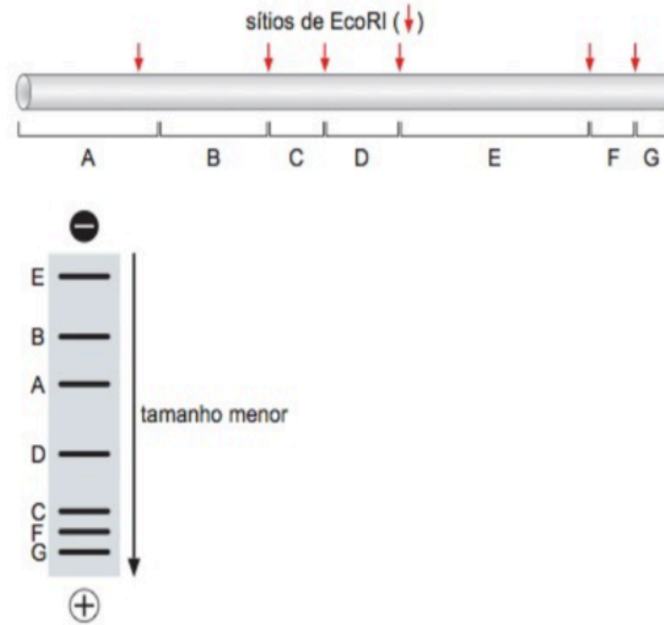
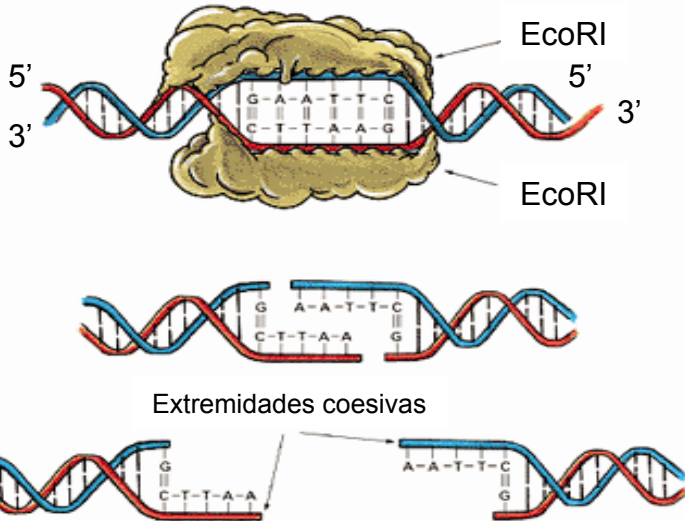
Enzima de restrição clivam moléculas de DNA em sítios específicos



- 1 Molécula de DNA
- 2 As enzimas de restrição reconhecem sequências específicas do DNA dupla-hélice, conhecidas como sequências de reconhecimento ou restrição
- 3 As enzimas de restrição cortam as moléculas de DNA com precisão

Endonucleases de restrição clivam moléculas de DNA em sítios específicos

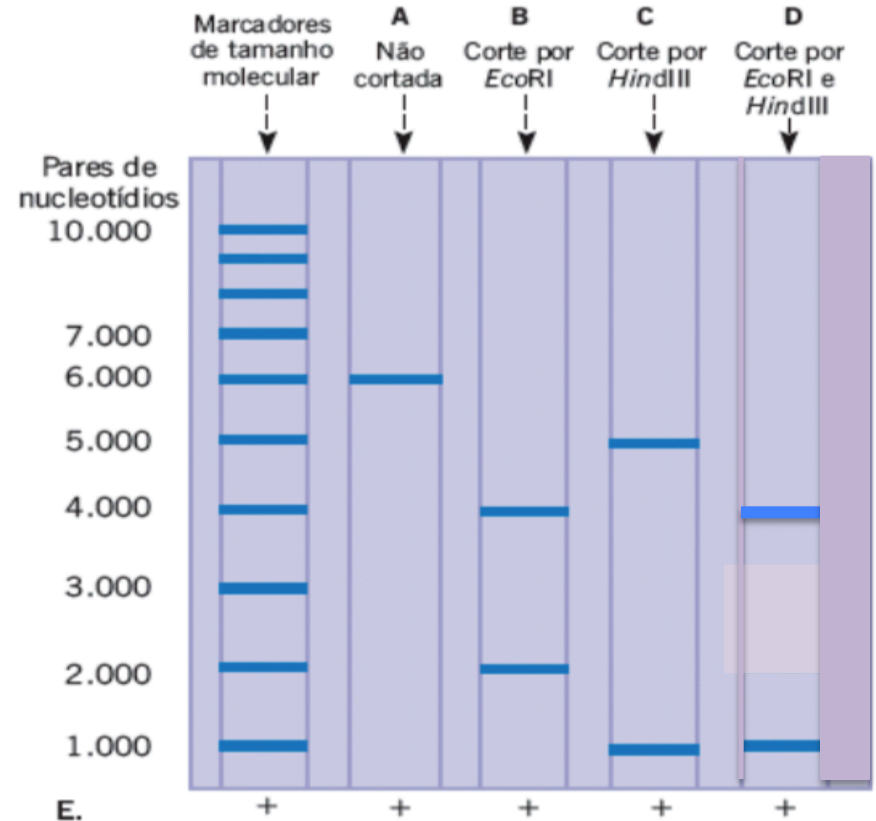
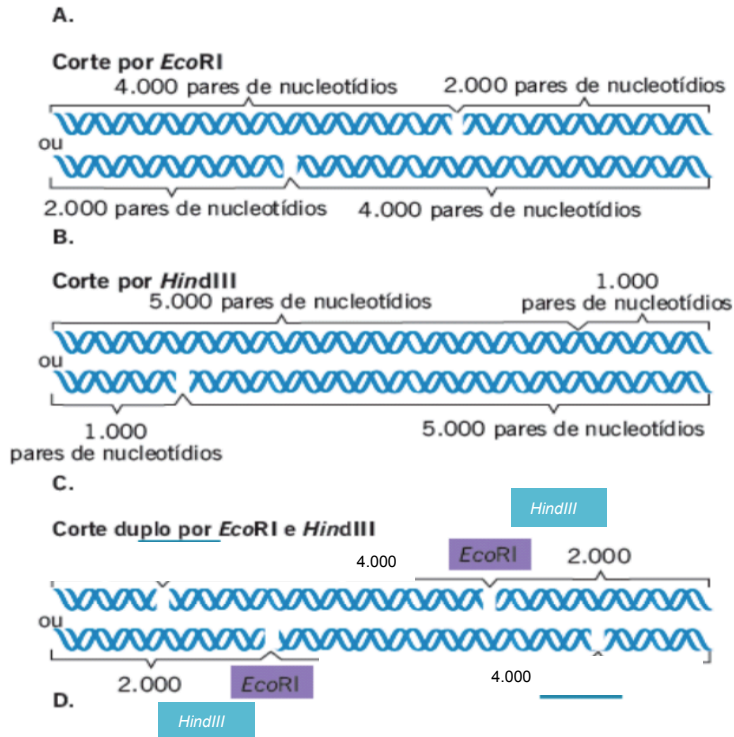
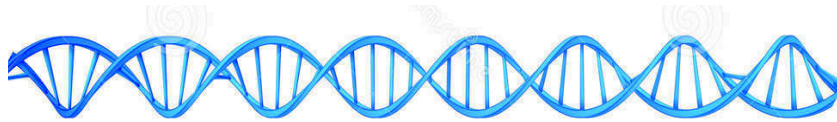
Seqüência de reconhecimento (ou de restrição) palindrômica



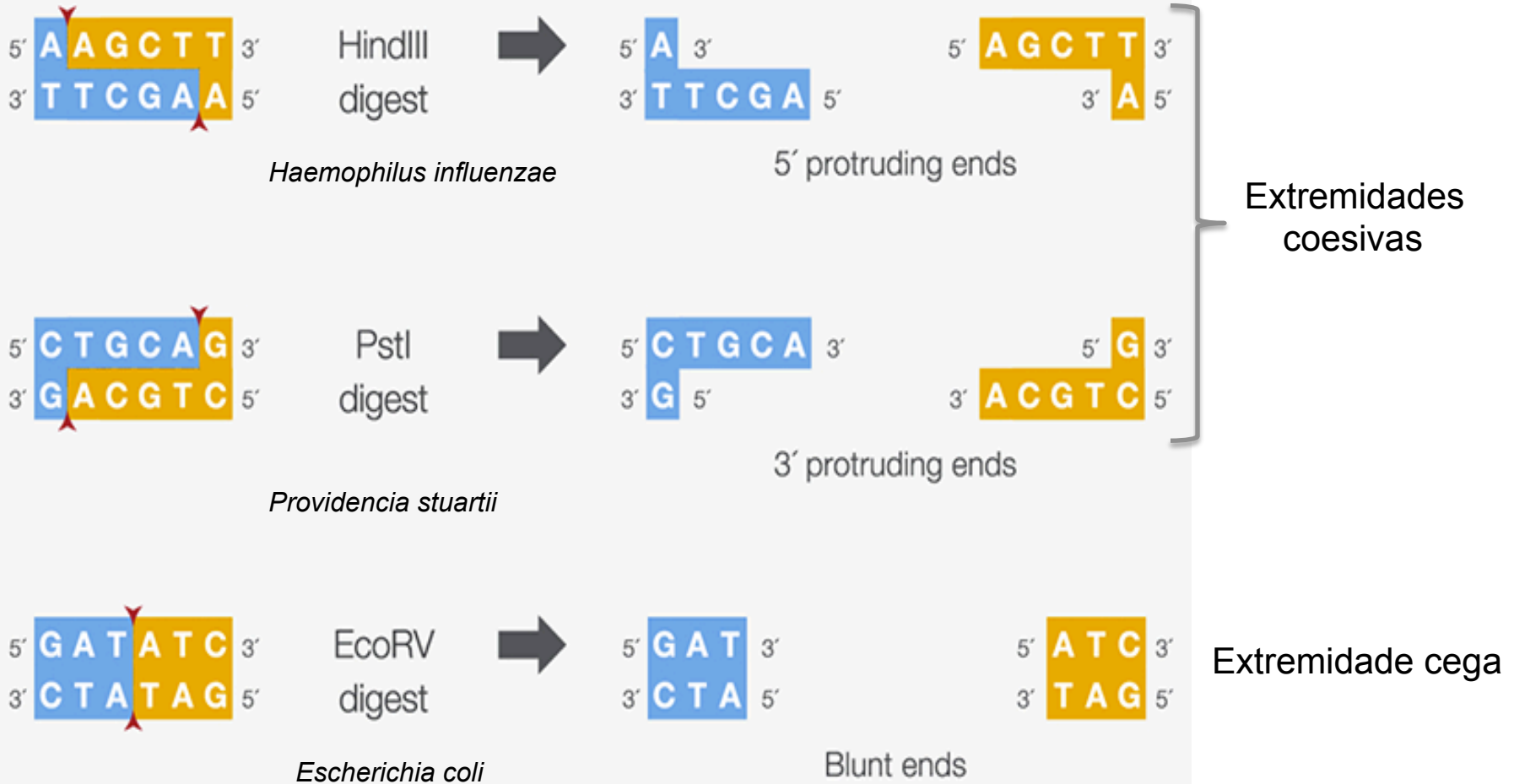
Enzima	Seqüência	Frequência de clivagem ^a
Sau3A1	5'-GATC-3'	0,25 kb
EcoRI	5'-GAATTC-3'	4 kb
NotI	5'-GCGGCCGC-3'	65 kb

^aFrequência = $1/4n$, em que n é o número de pares de bases da seqüência de reconhecimento.

Mapas físicos de moléculas de DNA baseados em locais de clivagem por enzimas de restrição



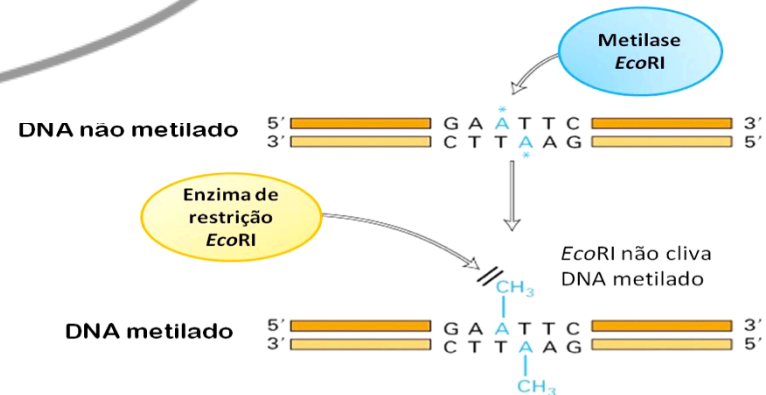
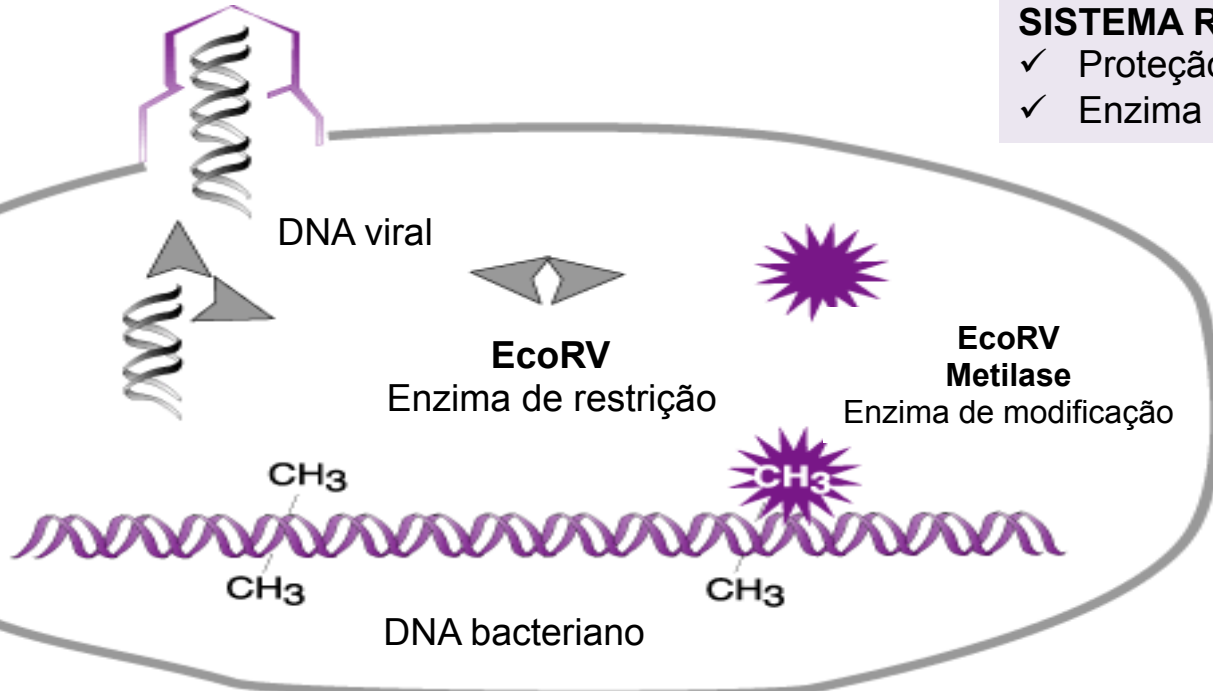
Enzima de restrição cortam as moléculas de DNA com precisão



Enzimas de restrição na natureza

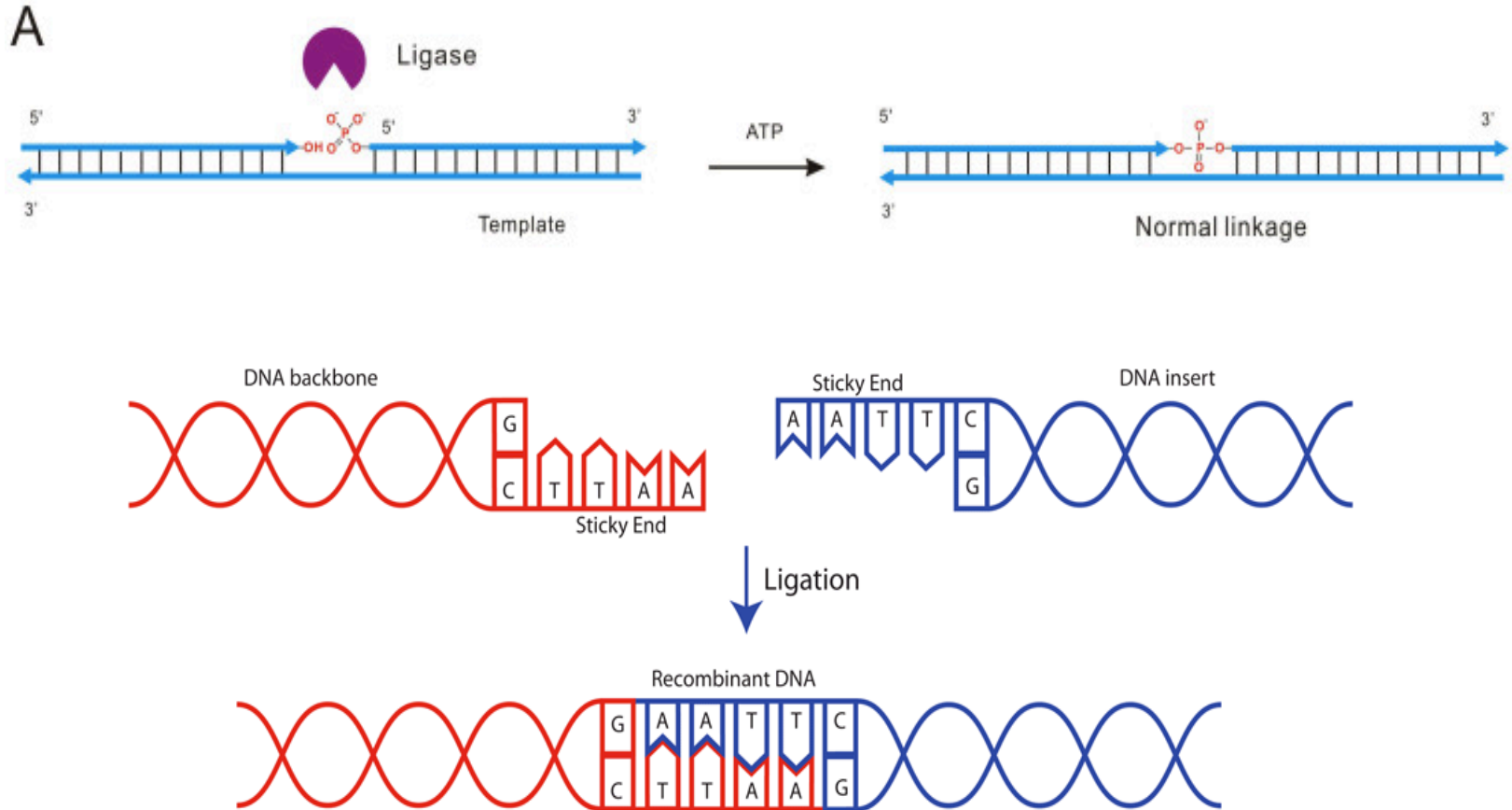
SISTEMA RESTRIÇÃO-MODIFICAÇÃO

- ✓ Proteção da célula contra invasores
- ✓ Enzima de modificação: **metilação**

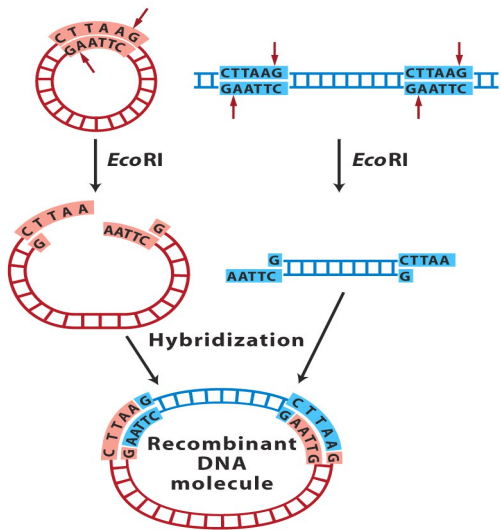


DNA ligase

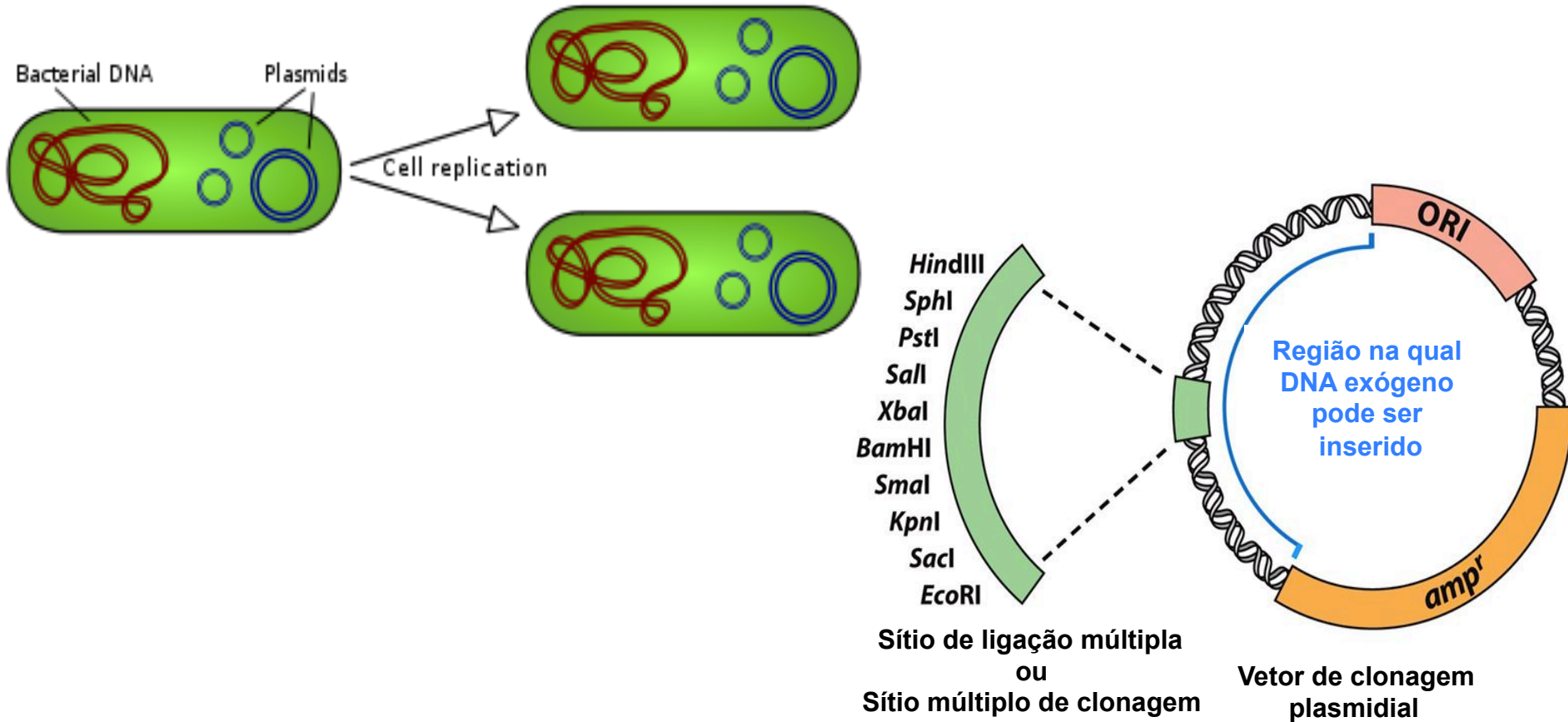
Novas combinações de seqüências de DNA



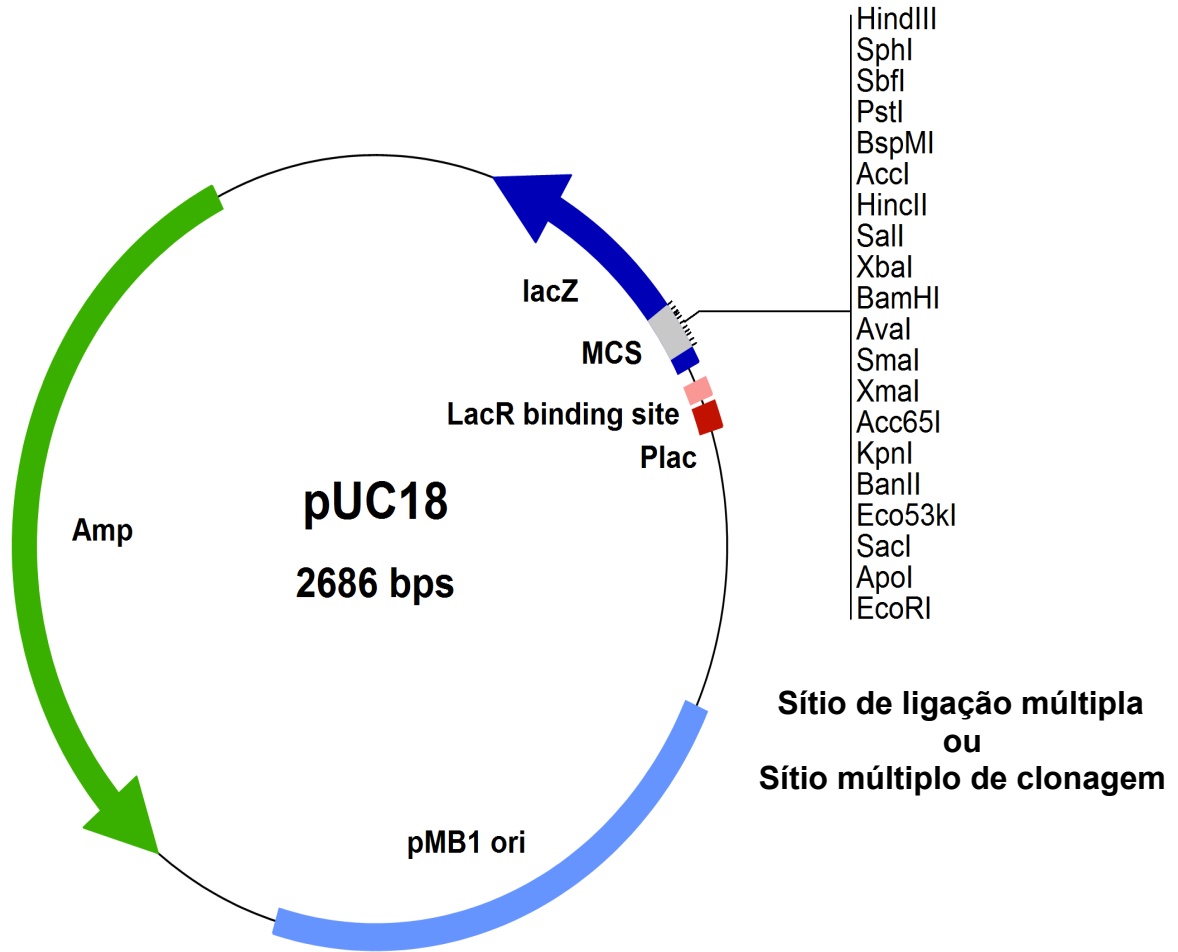
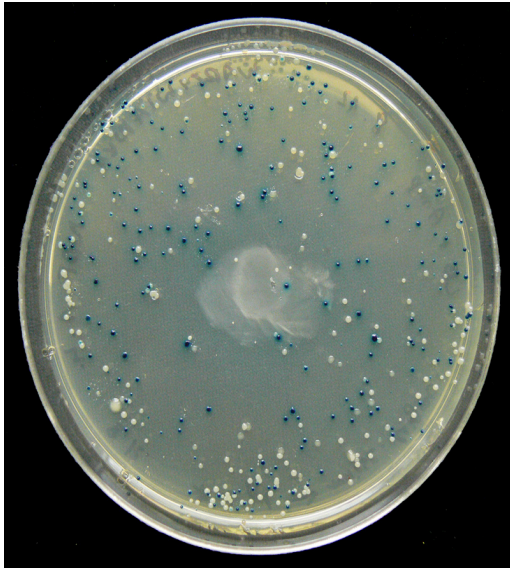
Vetores



Plasmídeos bacterianos são os principais vetores



Gene repórter *lacZ*

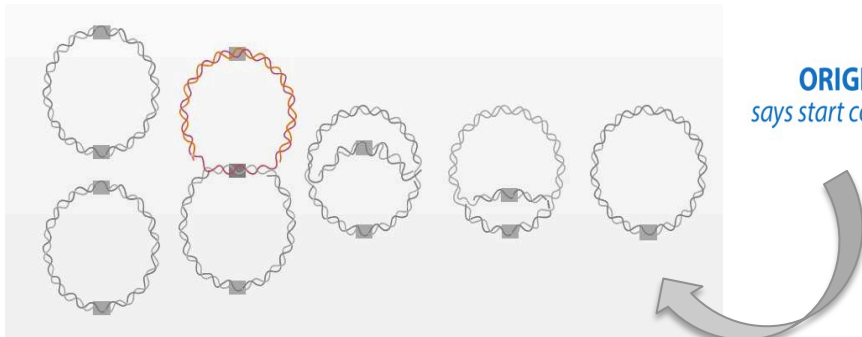
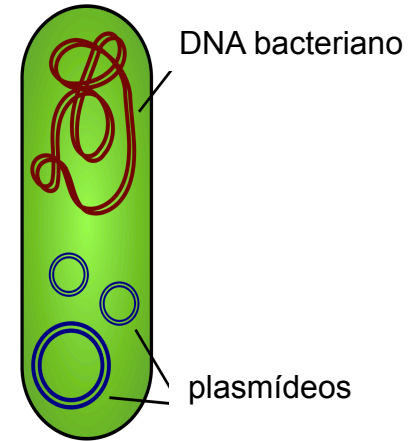
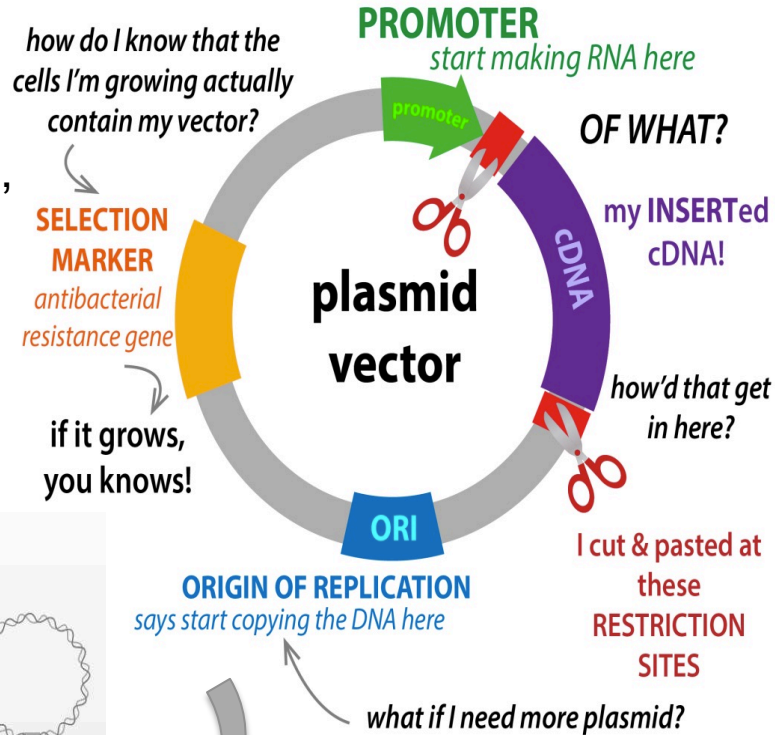


Características dos vetores

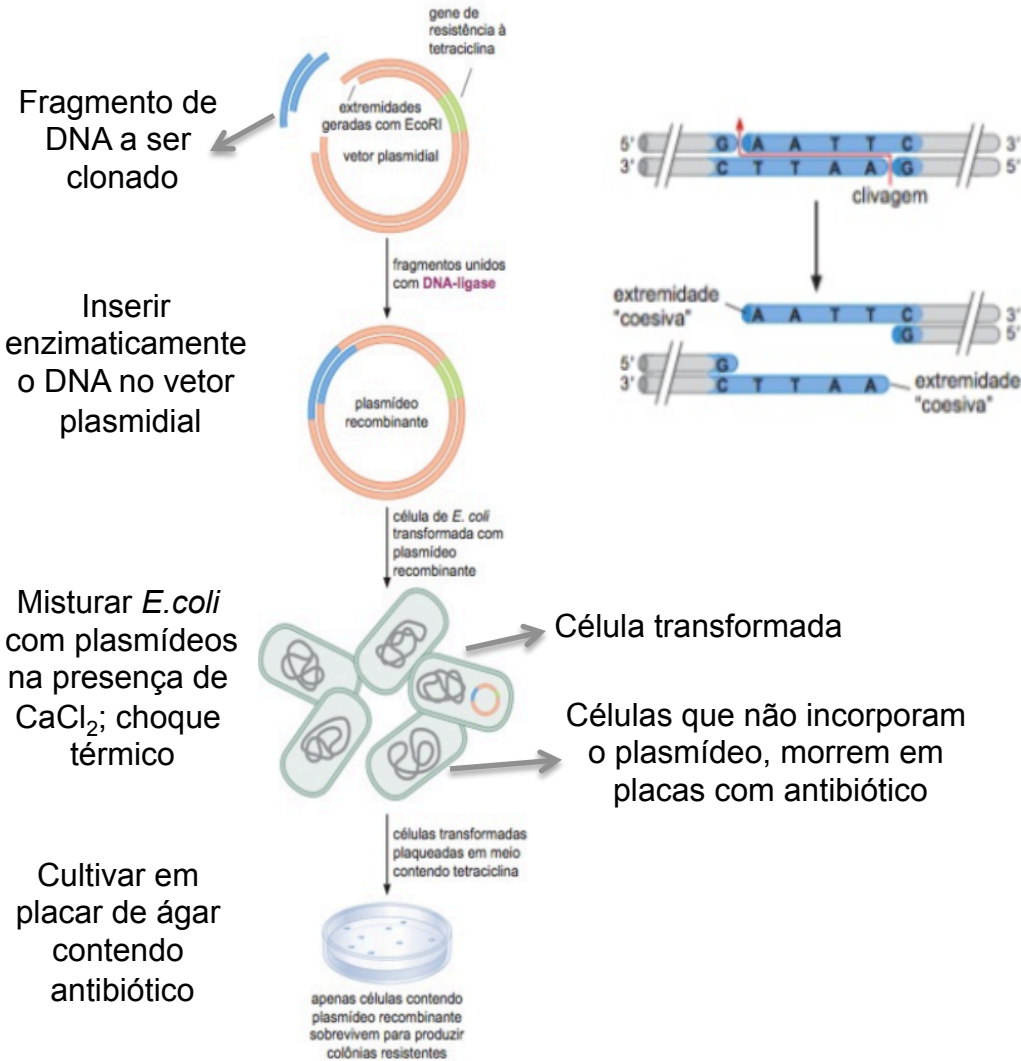
1. Origem de replicação

2. Marca de seleção (Amp, Kan)

3. Sítios específicos para enzimas de restrição



Etapas para obtenção do DNA recombinante



1. Digestão com a enzima de restrição para ambos os DNA (do vetor e do gene de interesse)
2. Inserção do gene de interesse no vetor
3. Por transformação, o DNA recombinante é inserido no organismo hospedeiro
4. Marca de seleção, à algum antibiótico, seleciona a célula contendo o DNA recombinante

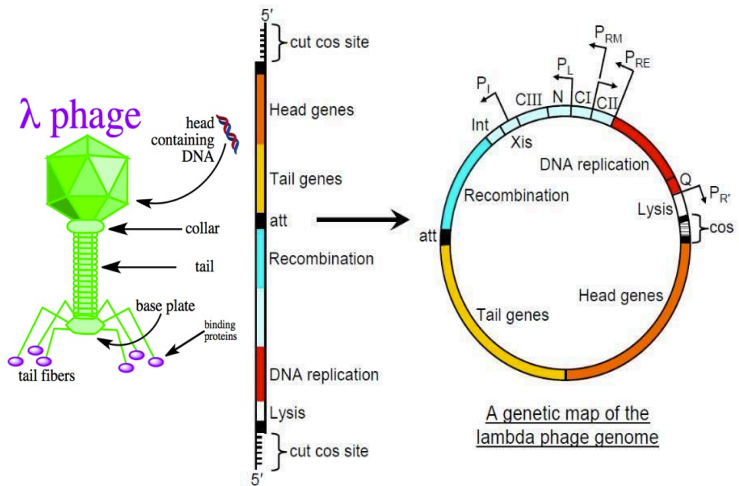
Fragmentos grandes de DNA são clonados em outros tipos de vetores

Plasmídeo: 1-10 kb

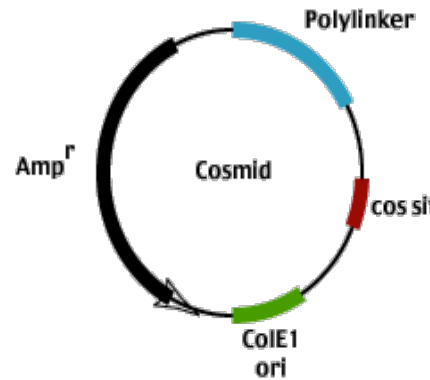
Bacteriófagos: 18 kb

Cosmídeos: 42 kb

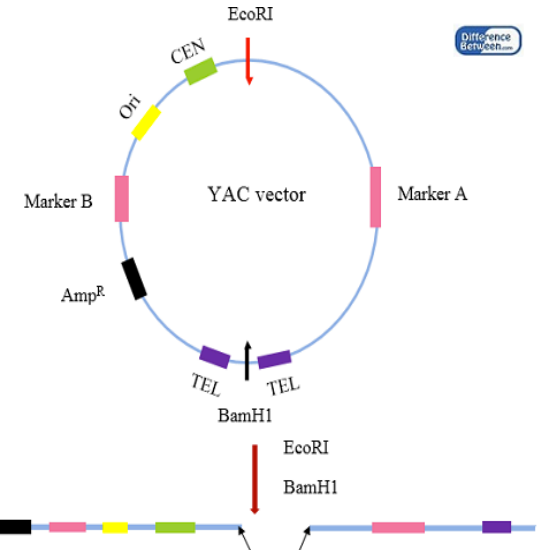
BAC e YAC: 300-1000 kp



48 kb



BAC: “bacterial artificial chromosome”
YAC: “yeast artificial chromosome”



Extremidades coesivas para inserção do DNA exógeno

ESTUDO DIRIGIDO

1. Princípio da tecnologia do DNA recombinante
2. Função das enzimas de restrição
3. Características dos vetores
4. Como a eletroforese é utilizada como ferramenta na Genética Molecular

Referência

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.**

Capítulo 5 - Técnicas de Genética Molecular (páginas 171-222). Lodish et al. Biologia Celular e Molecular. 7 Edição. Editora Artmed, 2014.



<http://www.addgene.org/protocols/diagnostic-digest/>

<https://www.youtube.com/watch?v=3esTzddSgX8&feature=youtu.be>