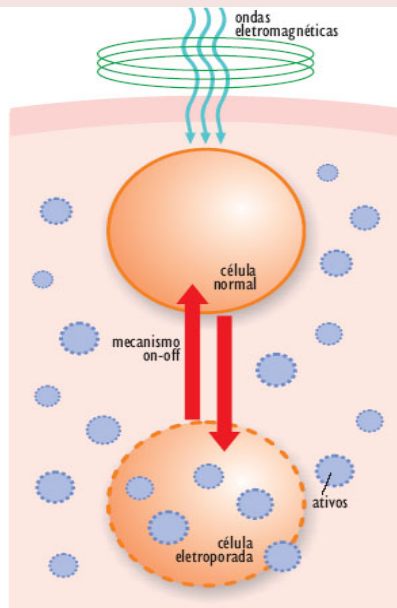


TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE: CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA



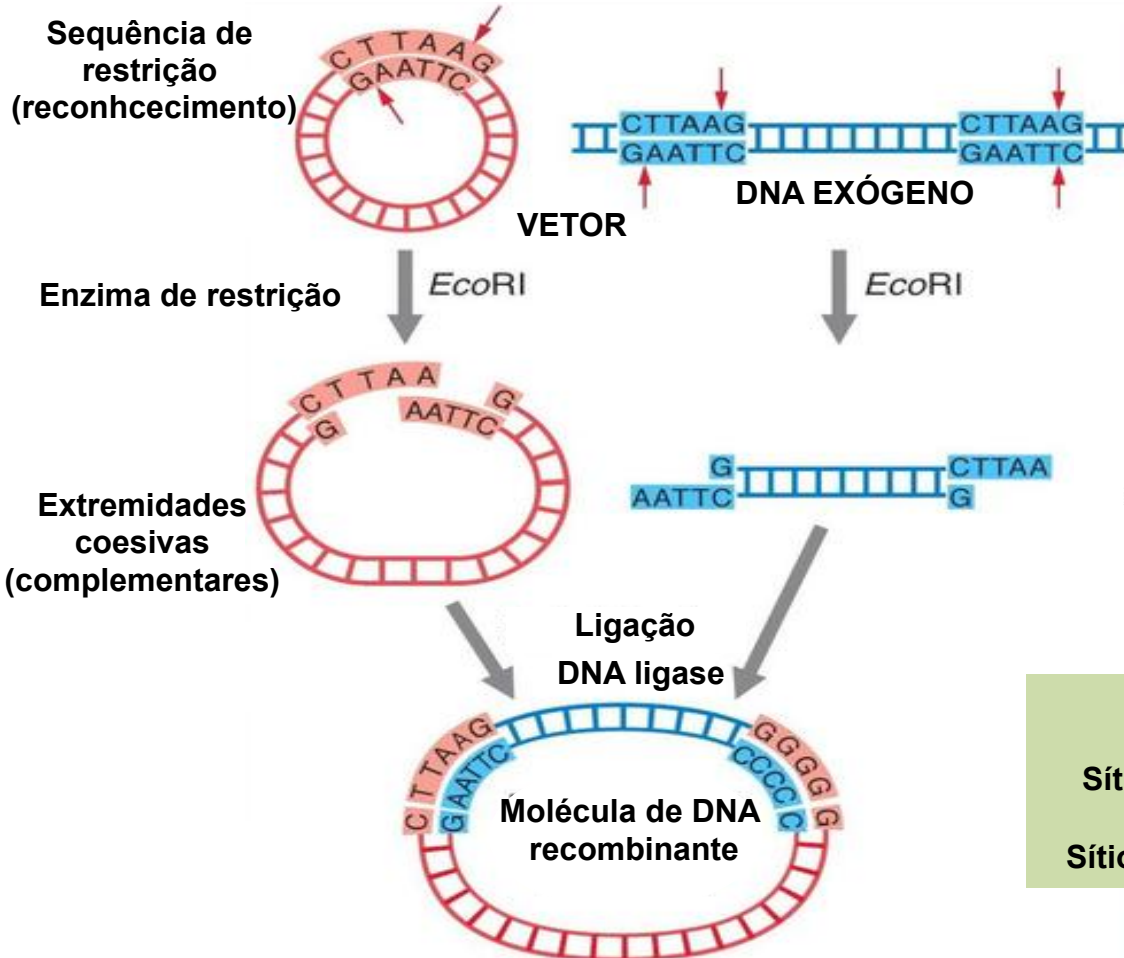
Aula 5

LGN0232 – Genética molecular

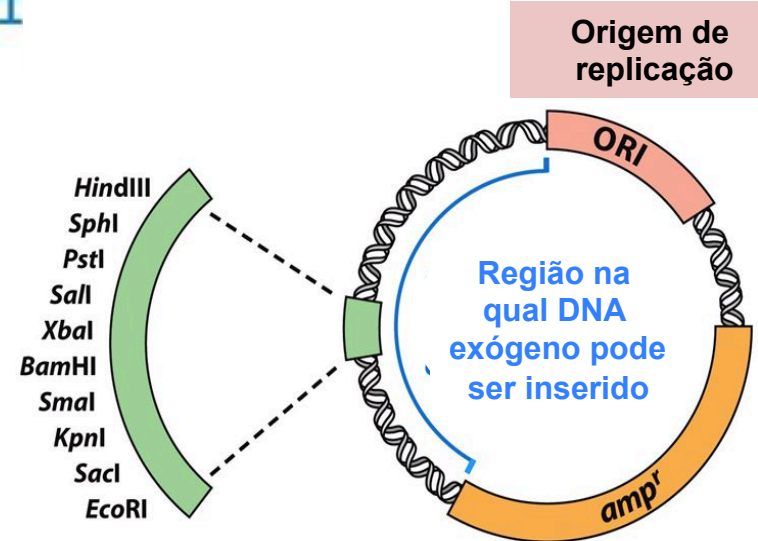
Thalita Peixoto Basso
Departamento de Genética
tpbasso@usp.br

- ✓ **Módulo 1:** Revisão do conceito de tecnologia do DNA recombinante
- ✓ **Módulo 2:** Clonagem
- ✓ **Módulo 3:** Transformação bacteriana
- ✓ **Módulo 4:** Seleção de transformantes
- ✓ **Questionários e-disciplinas**

Revisão do conceito de tecnologia do DNA recombinante



VETOR DE CLONAGEM PLASMIDIAL

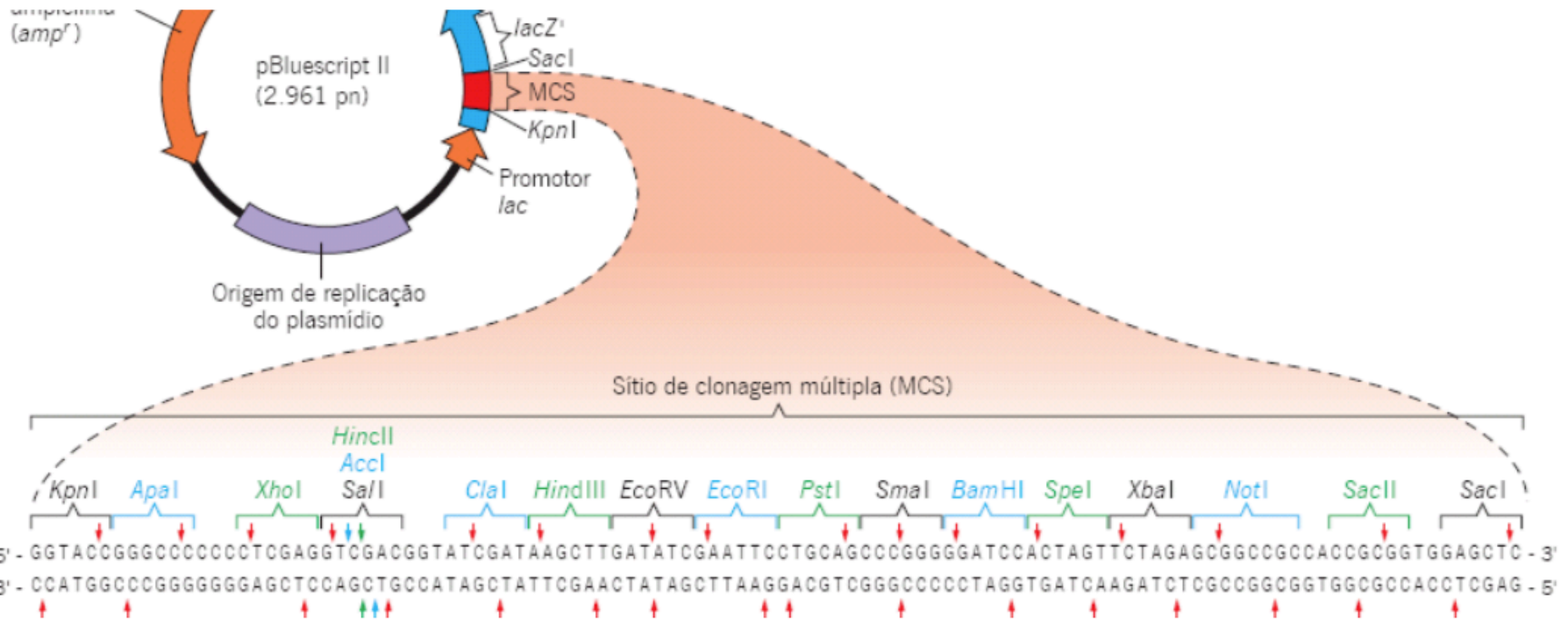


Polylinker
ou
Sítio de ligação múltipla
ou
Sítio múltiplo de clonagem

Marca de seleção

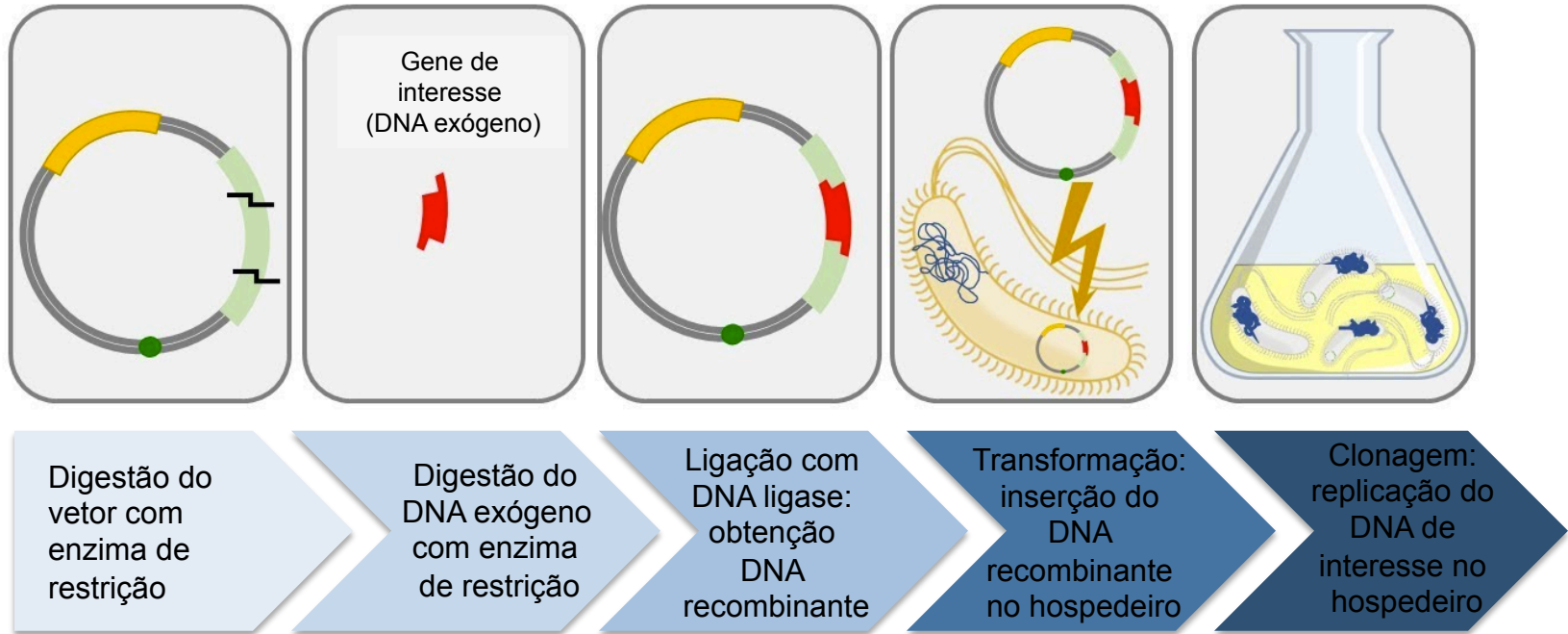
Sítio de clonagem múltipla

Aumenta a versatilidade do vetor plasmidial



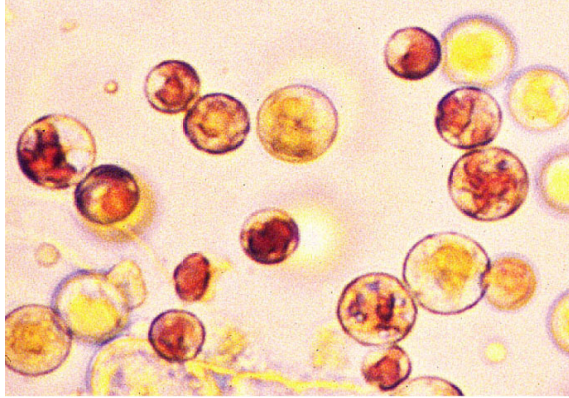
CLONAGEM CELULAR

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



CLONAGEM MOLECULAR

Dependente de células vivas

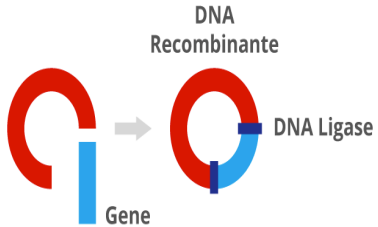


Independente de células vivas (PCR)



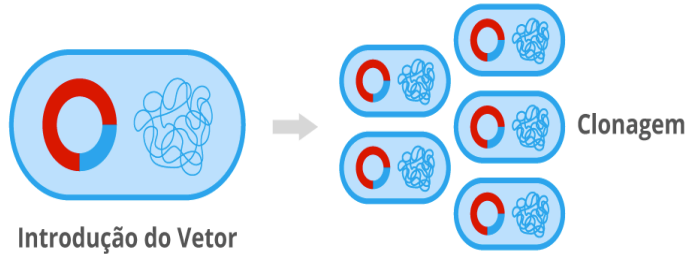
1ª etapa

Incorporação do gene de interesse no plasmídeo



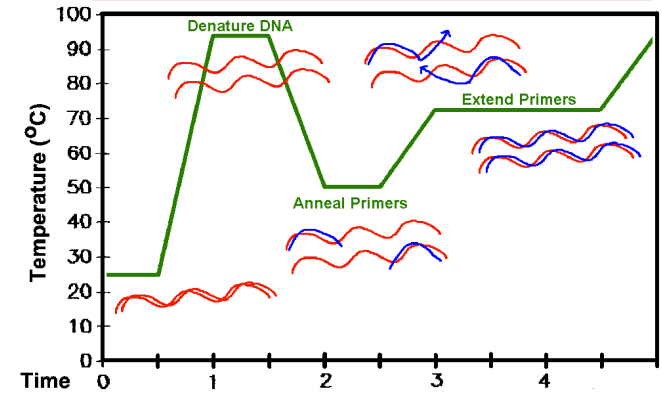
2ª etapa

Amplificação da molécula de DNA recombinante *in vivo*



DNA polimerase

Replicação da sequência de DNA de interesse *in vitro* - PCR



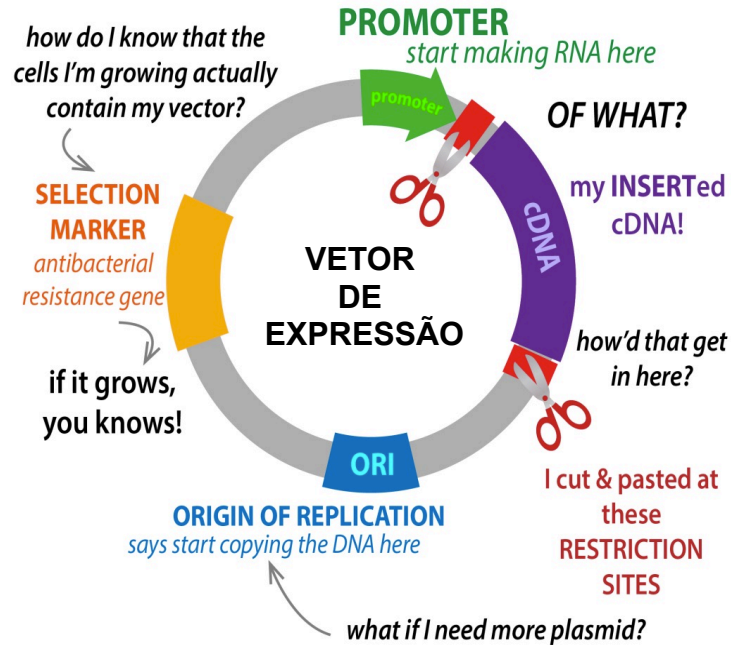
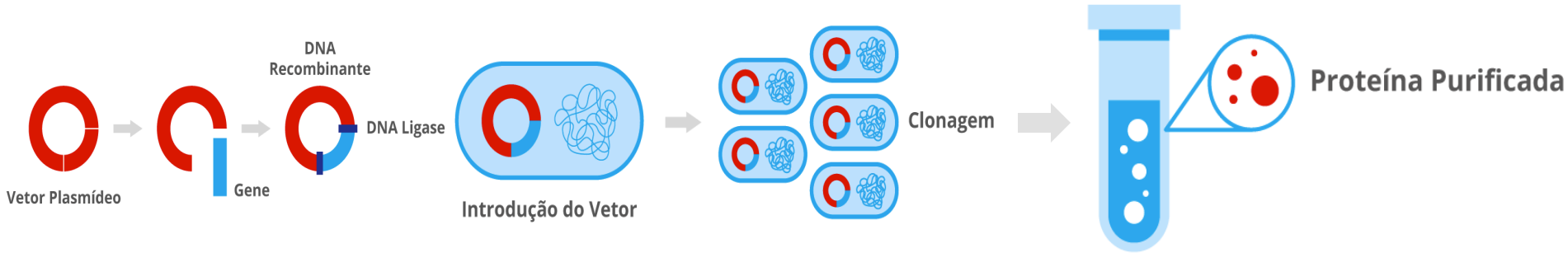
Etapas para clonagem



1. Digestão do vetor e fragmento de DNA (gene de interesse) com enzima de restrição
2. Obtenção do DNA recombinante por meio da DNA ligase
3. Transformação (introdução do DNA recombinante na célula hospedeira)
4. Clonagem (replicação do DNA recombinante na célula hospedeira)
5. Isolamento, sequenciamento e manipulação do fragmento de DNA purificado



A clonagem do DNA permite que qualquer proteína seja produzida em grande quantidade



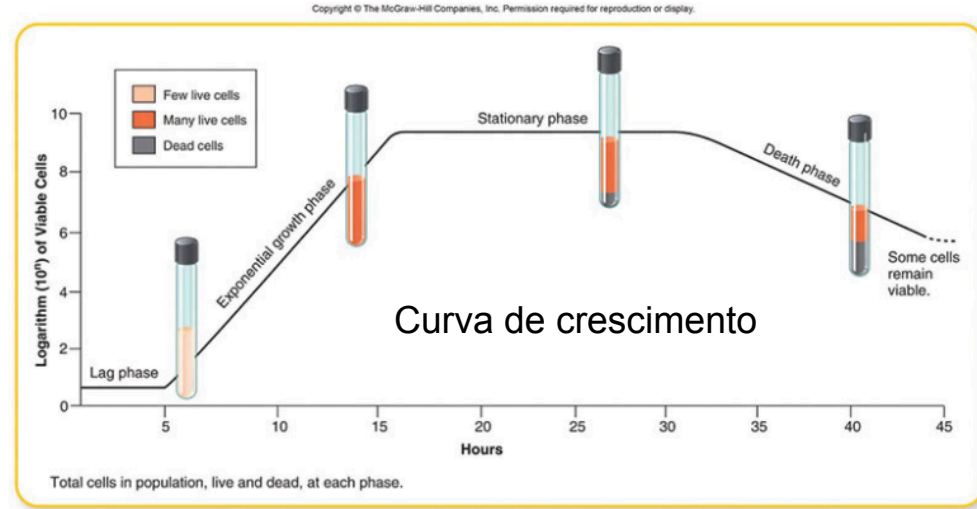
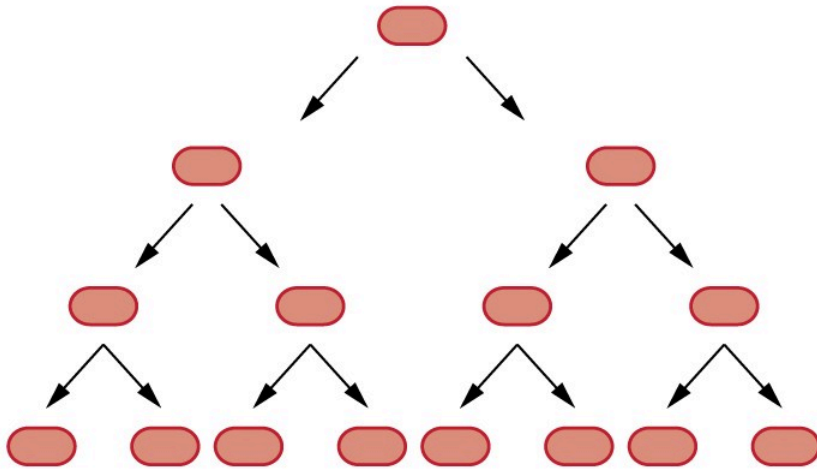
Vetores de expressão:

Plasmídeos que foram projetados para produzir uma grande quantidade de RNAm que pode ser traduzido de forma eficiente em proteína quando o plasmídeo é introduzido em células hospedeiras (bactéria, levedura, inseto, planta ou mamífero)

DNA recombinante é inserido em organismos hospedeiros por transformação



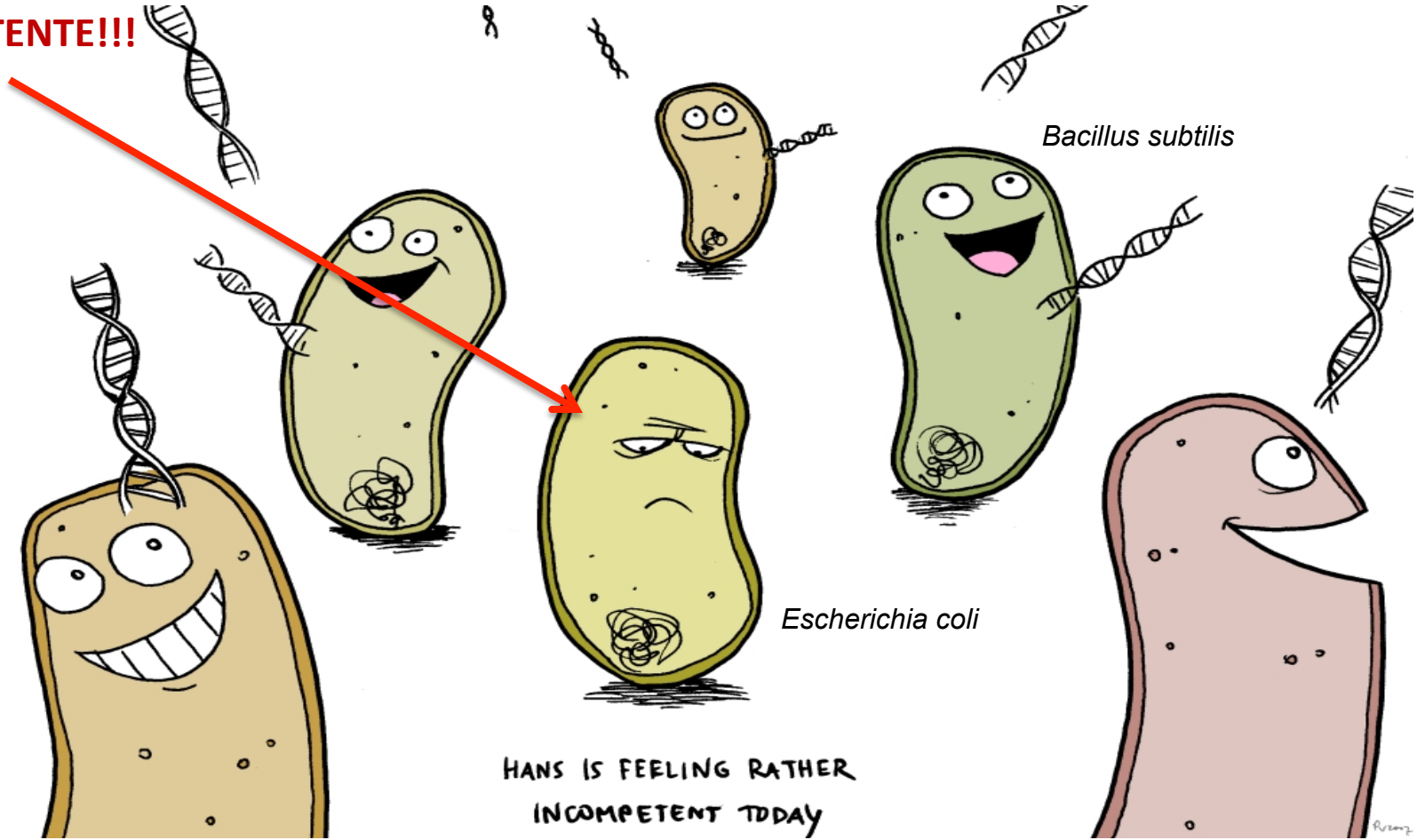
Tempo de geração bactérias: 20 min



CÉLULAS COMPETENTES

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

INCOMPETENTE!!!

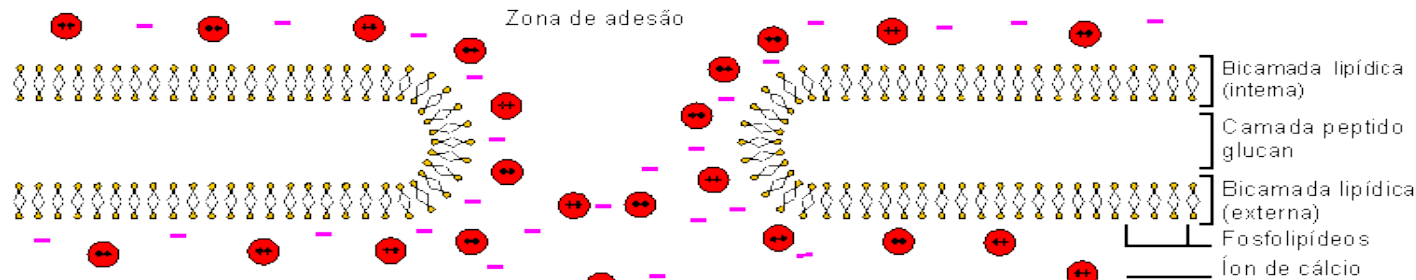


TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA


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



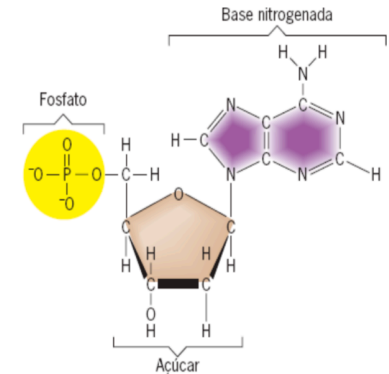
Mecanismo de captação do DNA



Plasmídeo

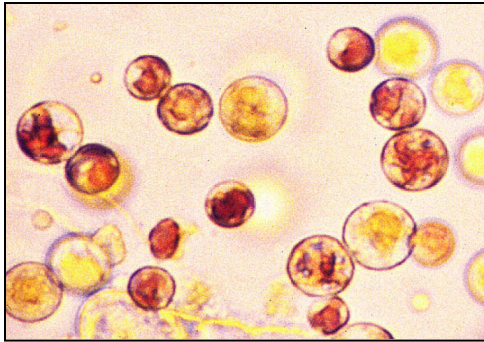
 Íons de cálcio (Ca^{2+})

Mandel e Higa, 1970

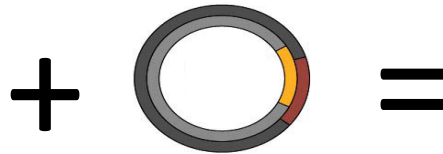


TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA

Suspensão de células competentes



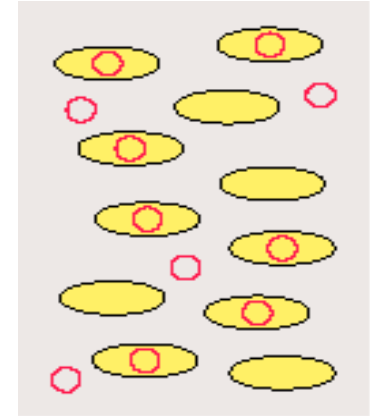
Moléculas de DNA recombinante



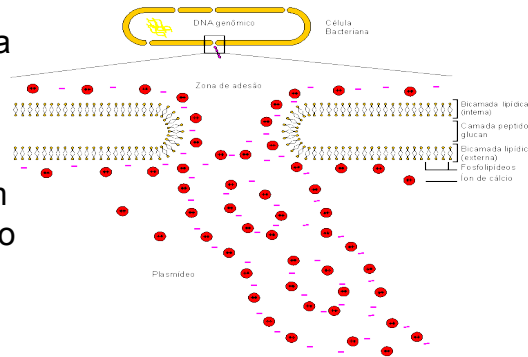
Incubar 30 min 0°C
gelo



Choque térmico
(42°C/30 s)



Tratamento com íons de cálcio em fase logarítmica (canais na membrana)



Íons de cálcio neutralizam a carga negativa do fosfato do DNA

Temperatura de 0°C: diminuir a fluidez da membrana

Choque térmico: desbalanço térmico, bombeamento do DNA através da zona de adesão

TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

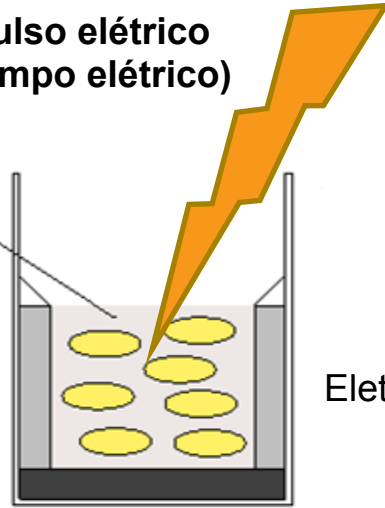
Eletroporador



Pulso elétrico
(campo elétrico)

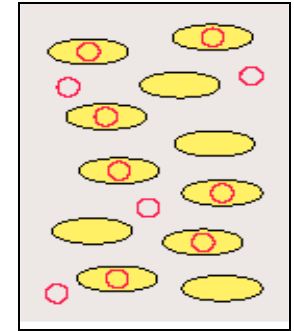
Suspensão
de células

Eletrodo



Eletrodo

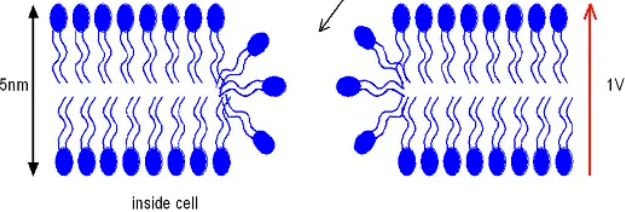
Cuveta



Pulso elétrico
(campo elétrico)

outside cell

pore



inside cell

1V

Incubação



Choque elétrico



Recuperação

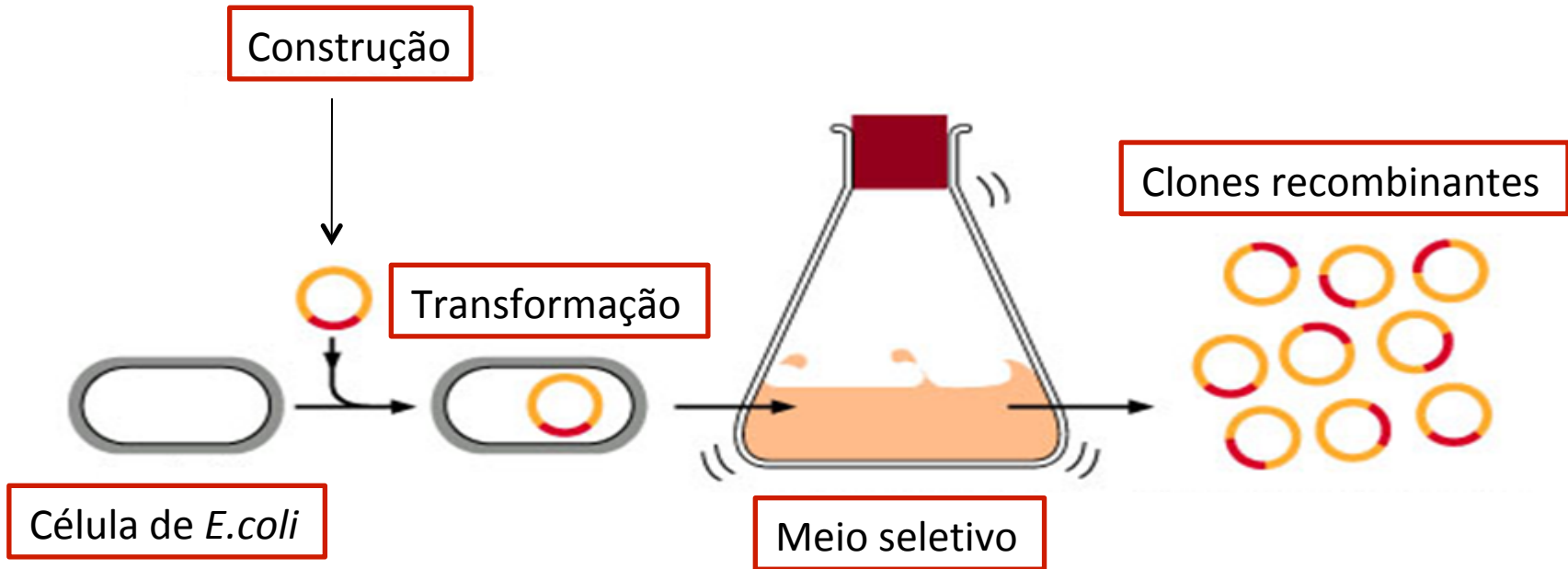


Célula competente

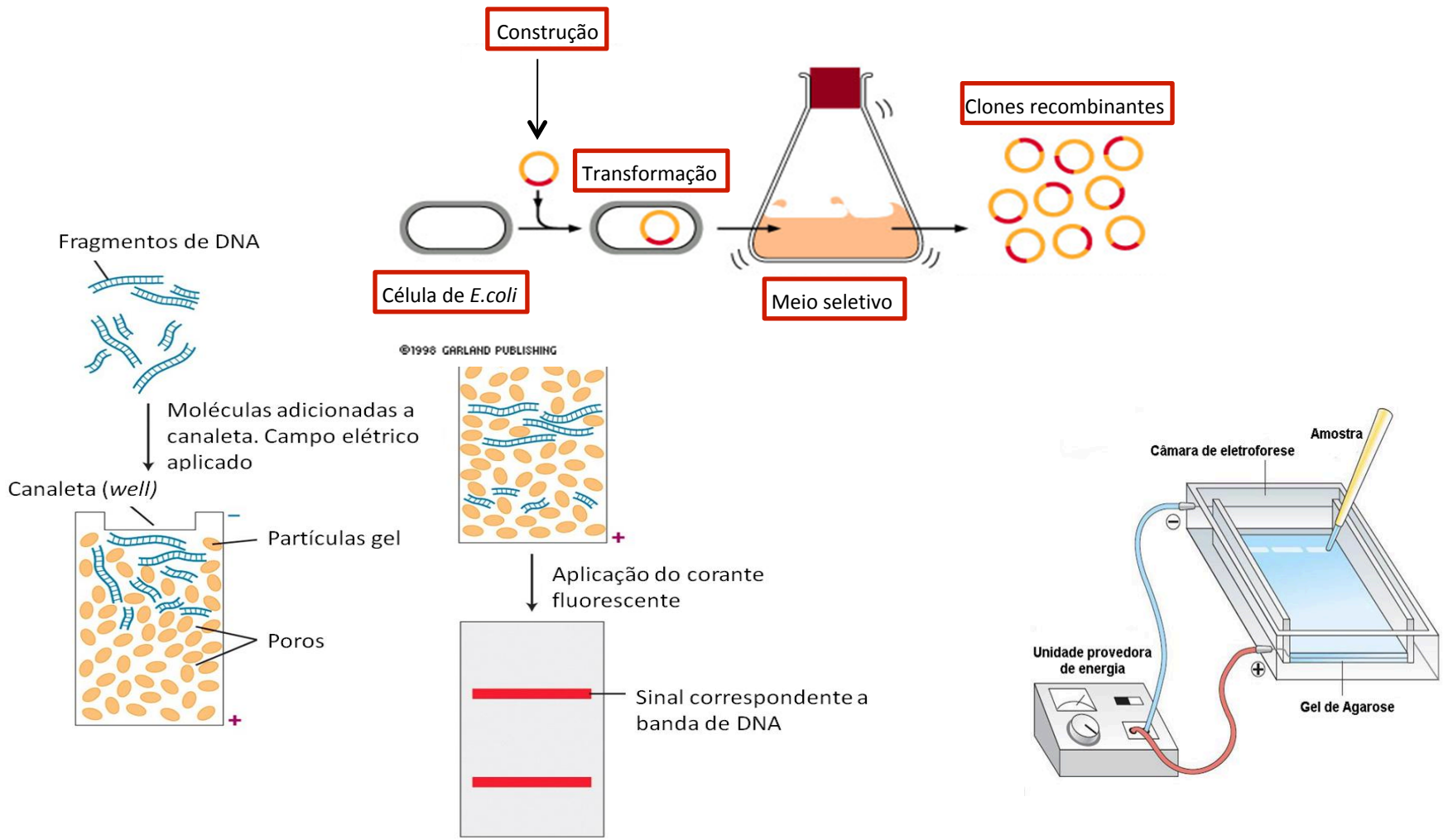
- ✓ Aumenta a permeabilidade da membrana
- ✓ Lipídeos sofrem rearranjo, criando canais

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

O DNA recombinante pode ser copiado no interior de células bacterianas

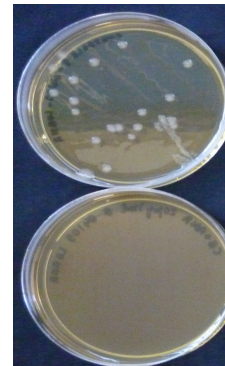
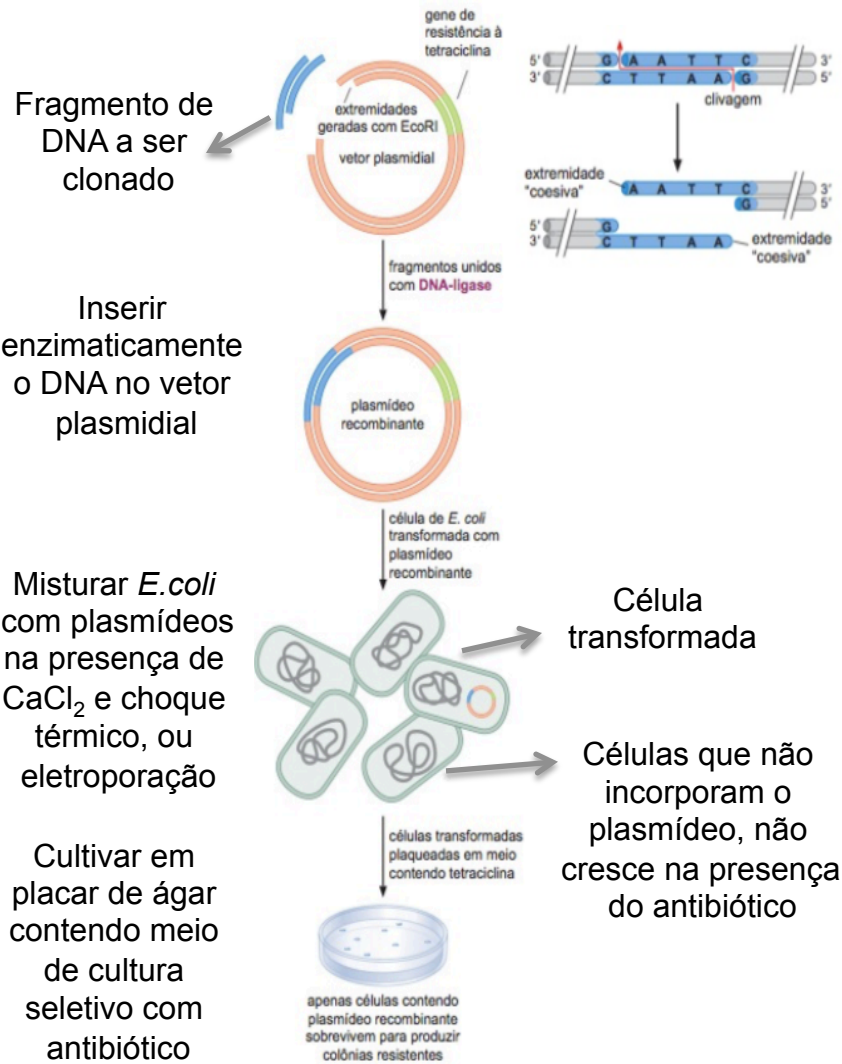


A eletroforese em gel permite a separação entre os DNAs do vetor e do fragmento clonado



ETAPAS PARA OBTENÇÃO E SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

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 – DNA ligase
3. Por transformação, o DNA recombinante é inserido no organismo hospedeiro (bactéria *E. coli*)
4. Clonagem do DNA recombinante através do cultivo do organismo hospedeiro em meio seletivo
5. Seleção da célula contendo o DNA recombinante através da marca de seleção ao antibiótico



MC + tetraciclina

Células transformadas
Clones resistentes a tetraciclina

Células controle (não transformadas)
Clones sensíveis a tetraciclina

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

Gene *lacZ* = codifica a enzima β -galactosidase

X-gal ou 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosídeo (incolor)
 β -galactosidase
Galactose + 5-bromo-4-cloroindigo (azul)

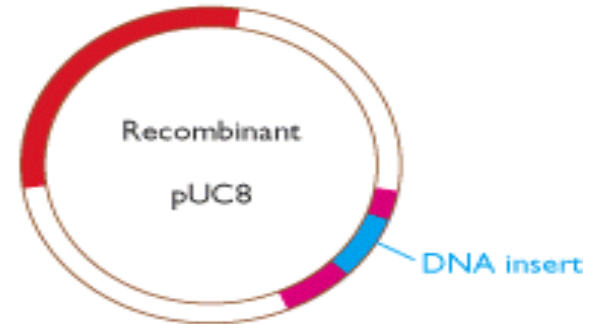


Gene de resistência à ampicilina



Sítio múltiplo de clonagem

- HindIII
- PstI
- Sall, AccI, HincII
- BamHI
- SmaI, XmaI
- EcoRI



Gene *lacZ* ativo

Produção da enzima β -galactosidase

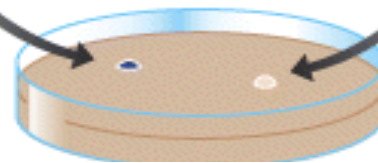
X-gal é metabolizado = **colônia azul**

Gene *lacZ* interrompido

Não há produção da enzima β -galactosidase

X-gal não é metabolizado = **colônia branca**

Ágar + ampicilina + **X-gal**



POSSÍVEIS RESULTADOS APÓS A ETAPA DE TRANSFORMAÇÃO

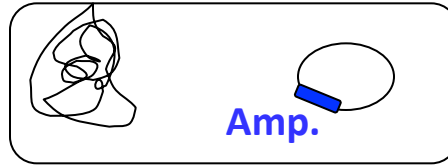
Gene *lacZ* = codifica a enzima β -galactosidase

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

✓ *LacZ* não funcional

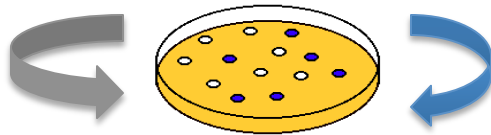
✓ *LacZ* funcional

✓ **Sem** gene *LacZ*

✓ **Colônias brancas**

✓ **Colônias azuis**

✓ **Sem** crescimento

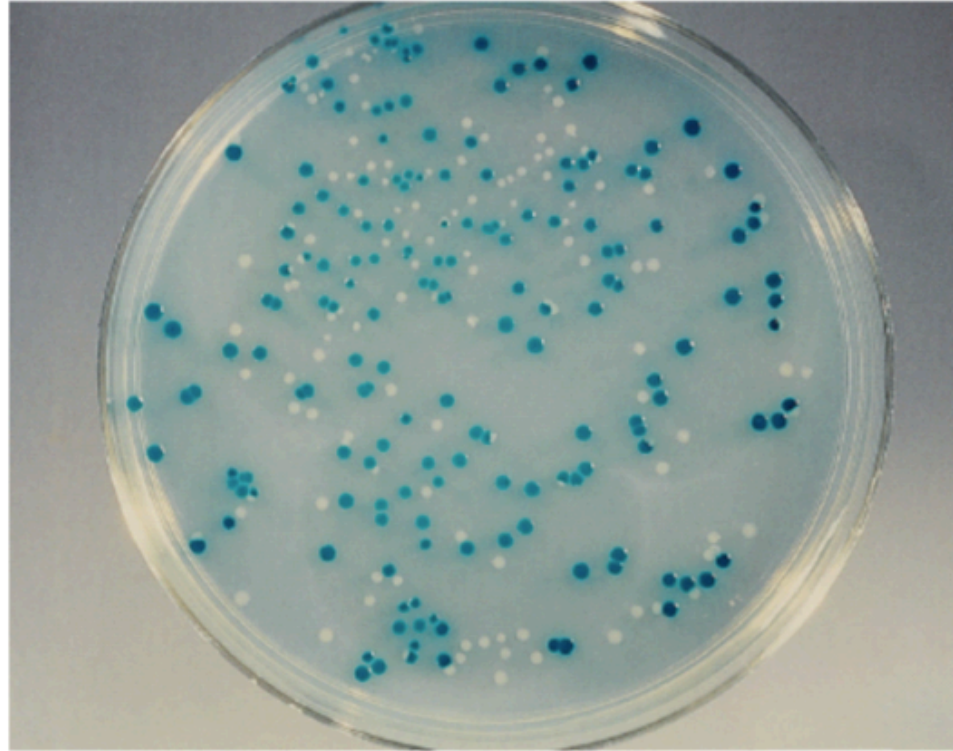


*MC = Meio de cultura

SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

Gene *lacZ* = codifica a enzima β -galactosidase

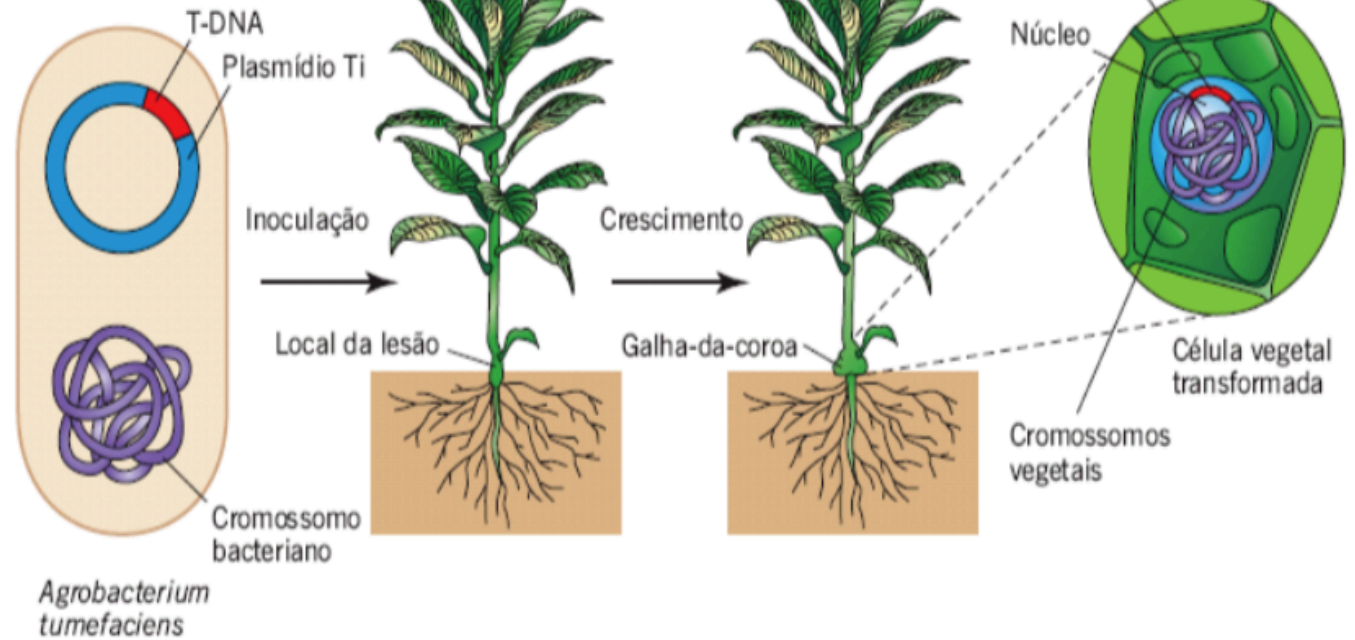
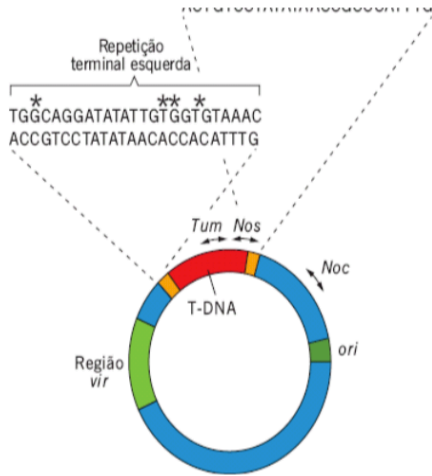
Quais colônias nos interessam e por quê?



Cortesia de S. Kopczak e D. P. Snustad, University of Minnesota.

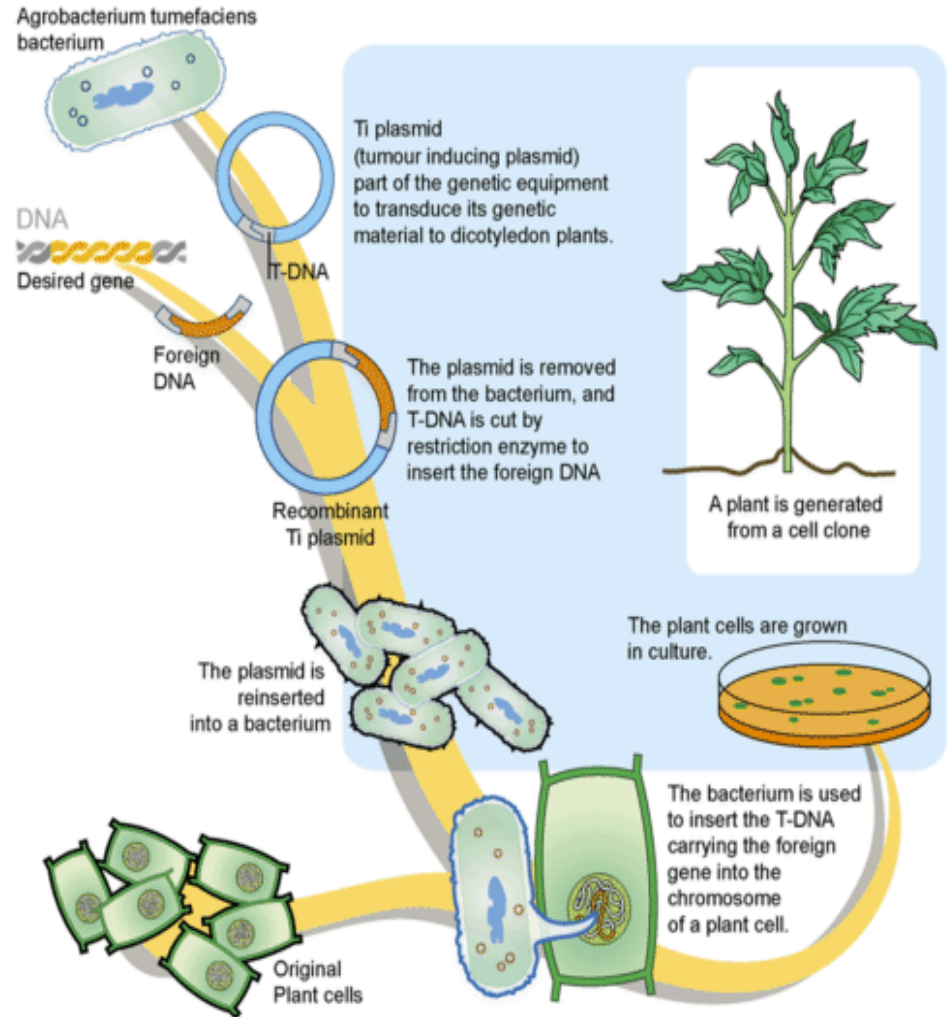
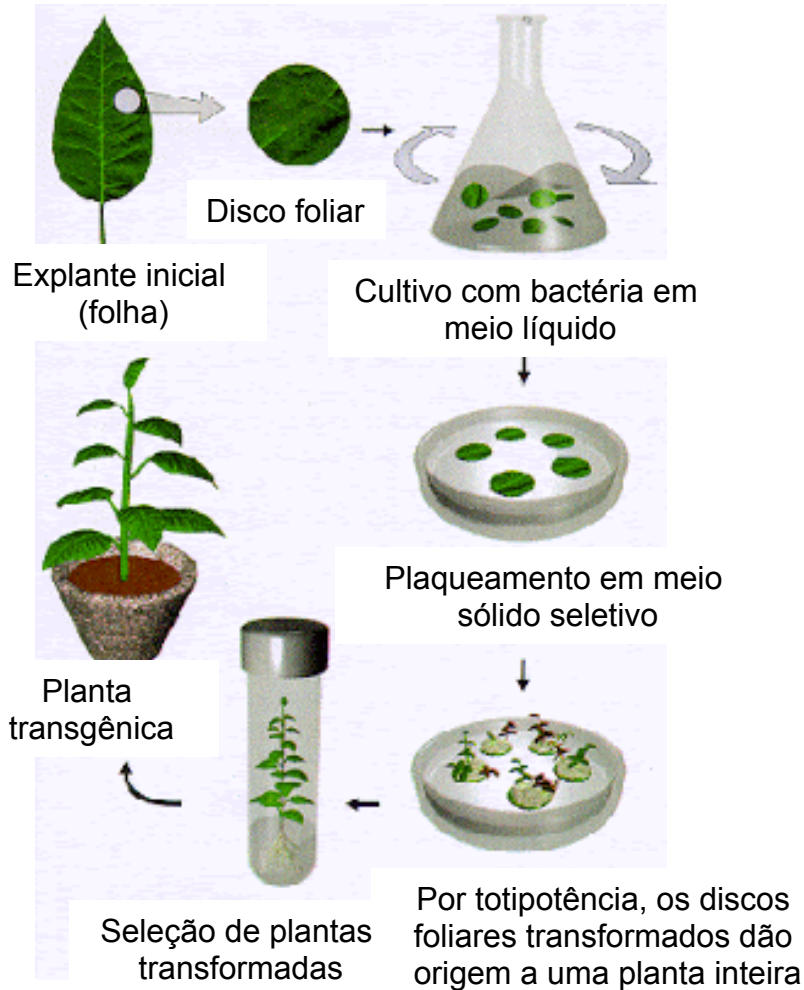
Vegetais transgênicos

Plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*



Vegetais transgênicos

Plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*



APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE



USP ESALQ – ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO

Veículo: A Tribuna Piracicabana

Data: 12/04/2015

Caderno/Link: A8

Assunto: Pesquisa cria leveduras para segunda geração

ETANOL

Pesquisa cria leveduras para segunda geração

Pesquisadora da Esalq cria leveduras tolerantes a estresse da fermentação para etanol de segunda geração

Atualmente, a produção de etanol de segunda geração (a partir de resíduos lignocelulósicos) é um grande desafio tecnológico. Uma das dificuldades é a necessidade de linhagens de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) robustas que tolerem os fatores estressantes da fermentação. Com o objetivo de obter tais linhagens, tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado de bagaço de cana, a engenheira agrô-

nama Thalita Basso realizou estudo sobre o tema no doutorado em Ciências, do Programa de Pós-Graduação (PPG) em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (USP/Esalq).

A pesquisa explorou a robustez das linhagens industriais de leveduras brasileiras, ainda não tolerantes o suficiente para suportar os estresses da fermentação do hidrolisado de bagaço. "Estas linhagens foram cruzadas entre si para resultar em linhagens híbridas ainda mais tolerantes aos inibidores", explica. Esta etapa do trabalho foi conduzida no laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Levedura, do Departamento de Ciências Biológicas. As linhagens selecionadas foram transferidas para a Universidade da Califórnia, onde foram geneticamente avaliadas e transformadas para a fer-

mentação de xilose, um dos açúcares presentes no hidrolisado de bagaço.

Segundo a pesquisadora, existe um grande esforço, tanto na academia como na indústria, para tornar realidade o etanol de segunda geração. "A Esalq sempre foi uma referência para o parque sucroalcooleiro do Brasil e essa pesquisa é uma modesta contribuição no rol dos importantes avanços tecnológicos já propiciados pela universidade". O trabalho contribui com leveduras apropriadas para uma produção de etanol empregando uma matéria-prima (bagaço de cana) mais econômica e ambientalmente apropriada.

Durante o doutorado, Thalita desfrutou de uma bolsa sanduiche na Universidade da Califórnia (Berkeley), tendo como supervisor o professor Adam Paul Arkin e, como tutor, Jeffrey Skerker. O professor Gon-



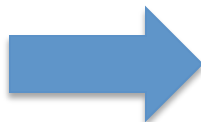
A engenheira agrônoma Thalita Basso

çalo Amarante Guimarães Pereira, da Unicamp, foi seu orientador. O trabalho também contou com a colaboração do biólogo e especialista em laboratório do Departamento de Ciências Exatas, Luiz Humberto Gomes, e o professor do De-

partamento de Ciências Biológicas, Luiz Carlos Basso. "A tese foi redigida e defendida em inglês na ESALQ, com participação de Skerker, que é pesquisador na área de produção de biocombustíveis do Energy Biosciences Insti-

tute e da Universidade da Califórnia", conta Thalita. O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Ethanol



Fragmento de DNA a ser clonado X123

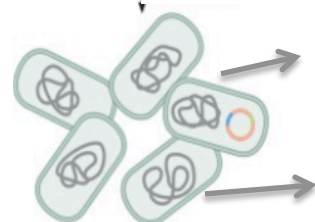


Inserir enzimaticamente o DNA no vetor plasmidial

fragmentos unidos com DNA-ligase



Transformação (misturar *S.cerevisiae* com plasmídeos)



Célula transformada

Células que não incorporam o plasmídeo, não cresce na presença do antibiótico

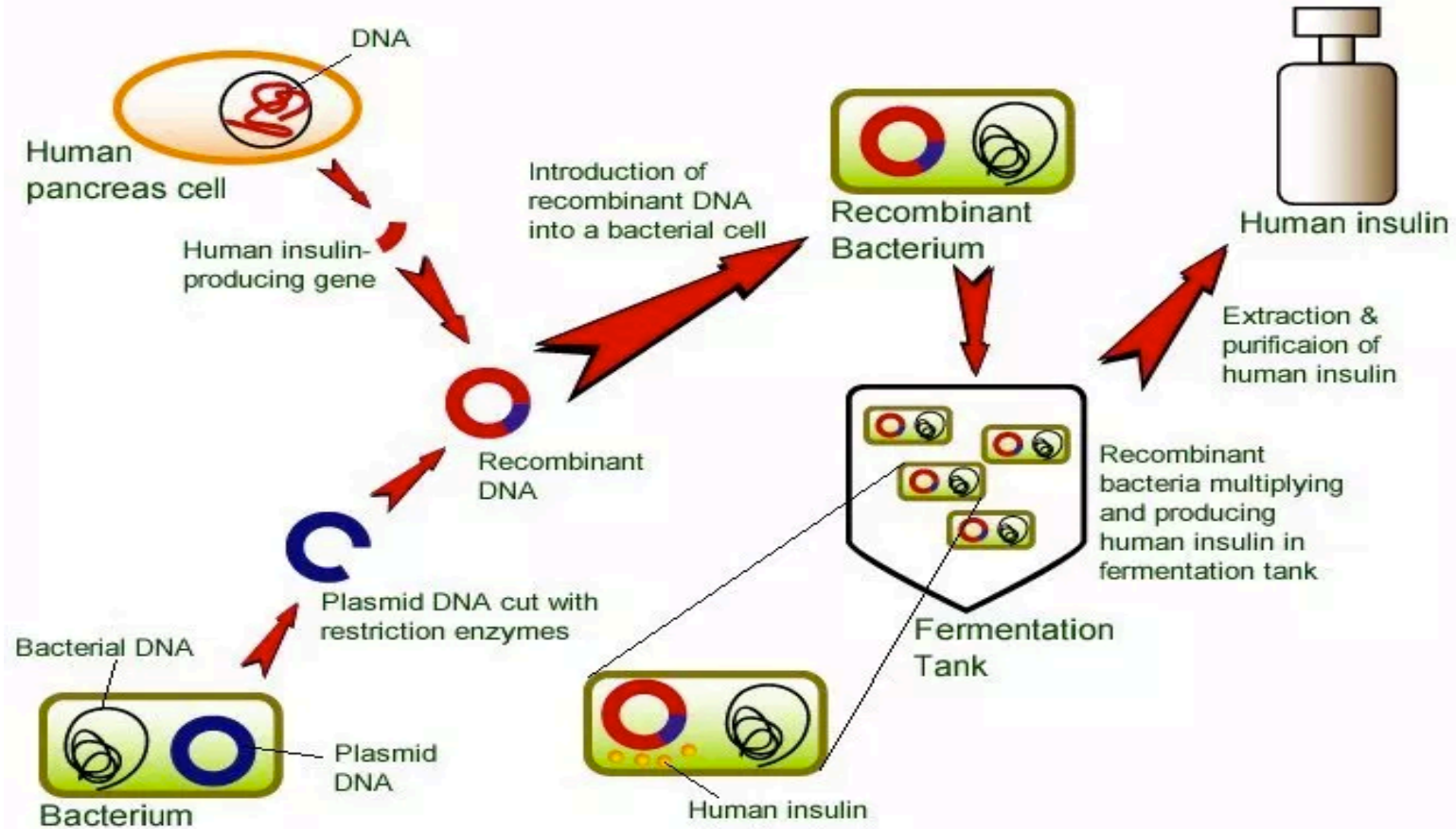
células transformadas plaqueadas em meio contendo tetraciclina



apenas células contendo plasmídeo recombinante sobrevivem para produzir colônias resistentes

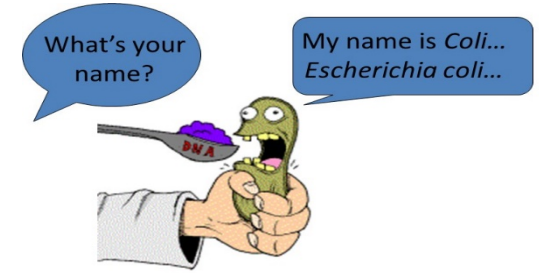
Seleção em meio de cultura seletivo com antibiótico

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE E PRODUÇÃO DE INSULINA HUMANA



ESTUDO DIRIGIDO

1. O que é transformação bacteriana?
2. Qual o princípio da transformação bacteriana?
3. Quais as aplicações da transformação bacteriana?
4. Como se faz a seleção de uma bactéria transformada?



BIBLIOGRAFIA

Capítulo 14 – Técnicas de Genética Molecular. Snustad, D.P.; Simmons, M.J. **Fundamentos de Genética.** 7ª edição. Editora Guanabara Koogan.

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.** 7ª edição. Editora Artmed, 2014.