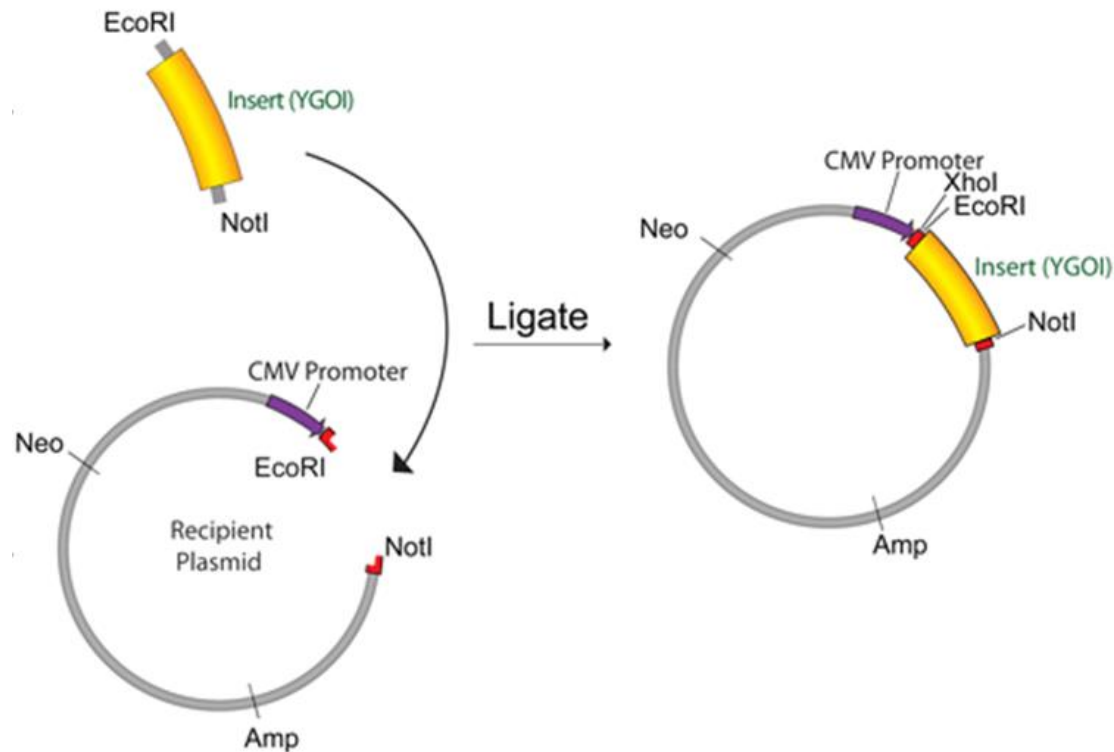


Métodos de Clonagem do inserto no Vetor



(mais) Análise de sequências

```

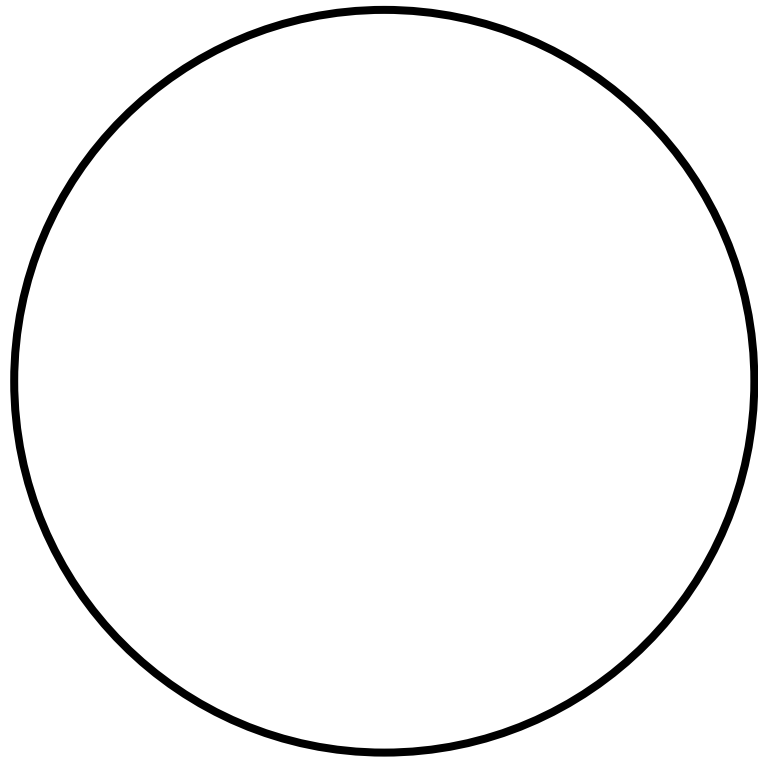
      30          40          50          60
VEEAKKVKPTVVVNAANVYLKHGGG-VAGALNKATNNAMQVESD
- GDITLLEVD AIVNAANASLLGGGG-VDGCIHRAAGPCLLAE--
- SDITKLEVD AIVNAANASSLLGGGG-VDGCIHRAAGPLLTD--
- GDIA TEQVDVIVNSTARTFN RKSG-VSRAILEGAGQAVESE--
- GDITKEEADVIVNSTSN SFNLKAG-VSKAILECAGQNVERE--
- GDVLYIWADVIVNSVPMN LQLGGGPLSRAFLQKAGPMLQKELD
- EGVQNAKT D VVVNSVPLDLVLSRGPLSKSLLEKAGPELQEELE
  
```

Nicolas Hoch
QBQ2457 – 2023

Aula 3

Como ocorre a clonagem?????

Plasmídeo



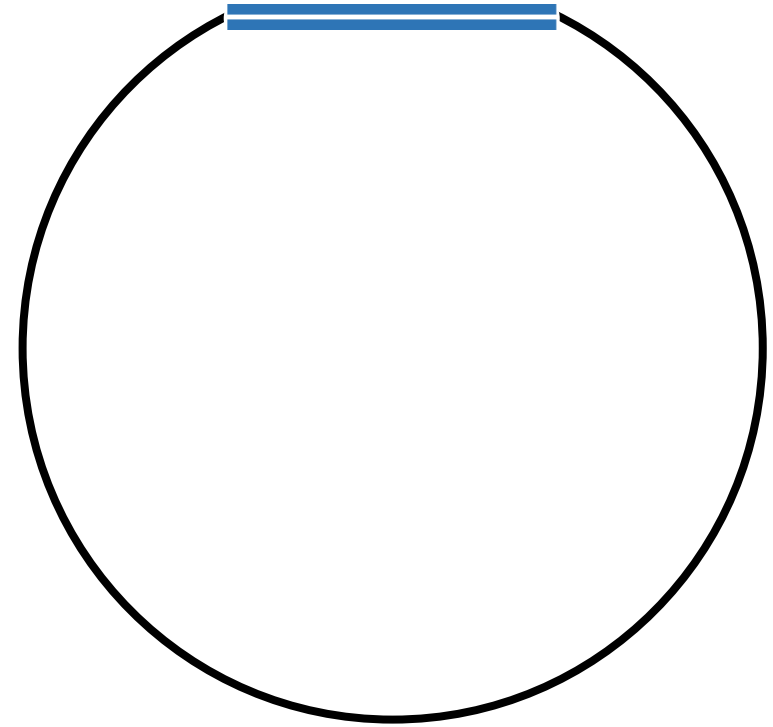
Produto de PCR

+

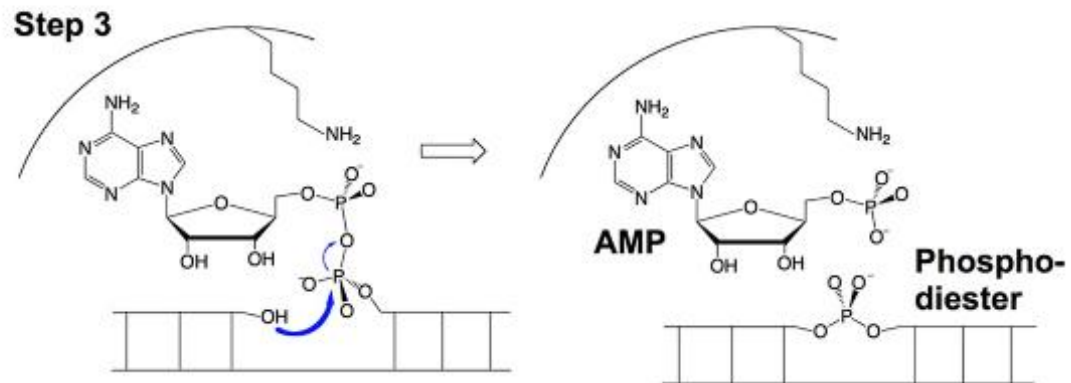
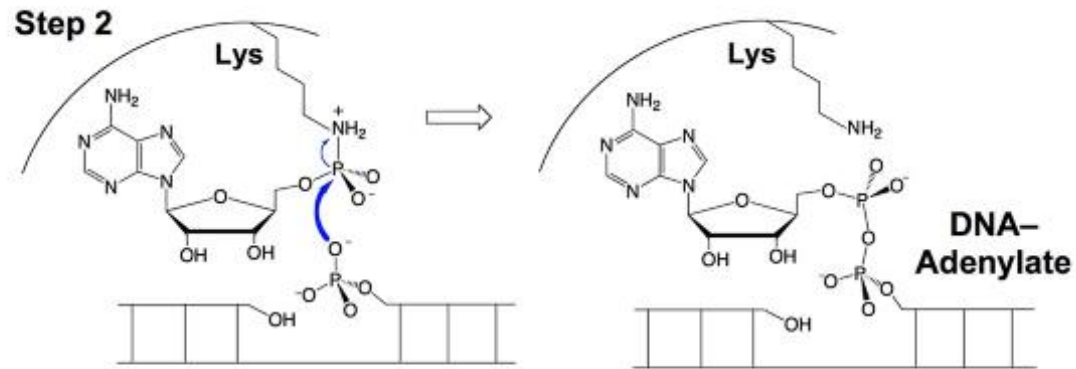
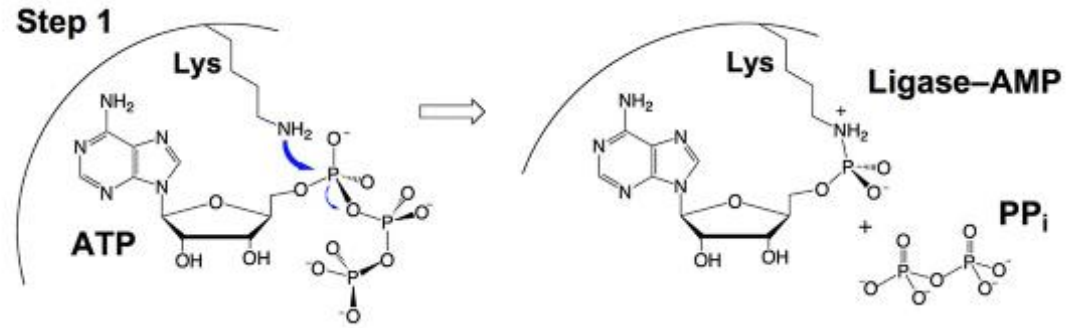


=

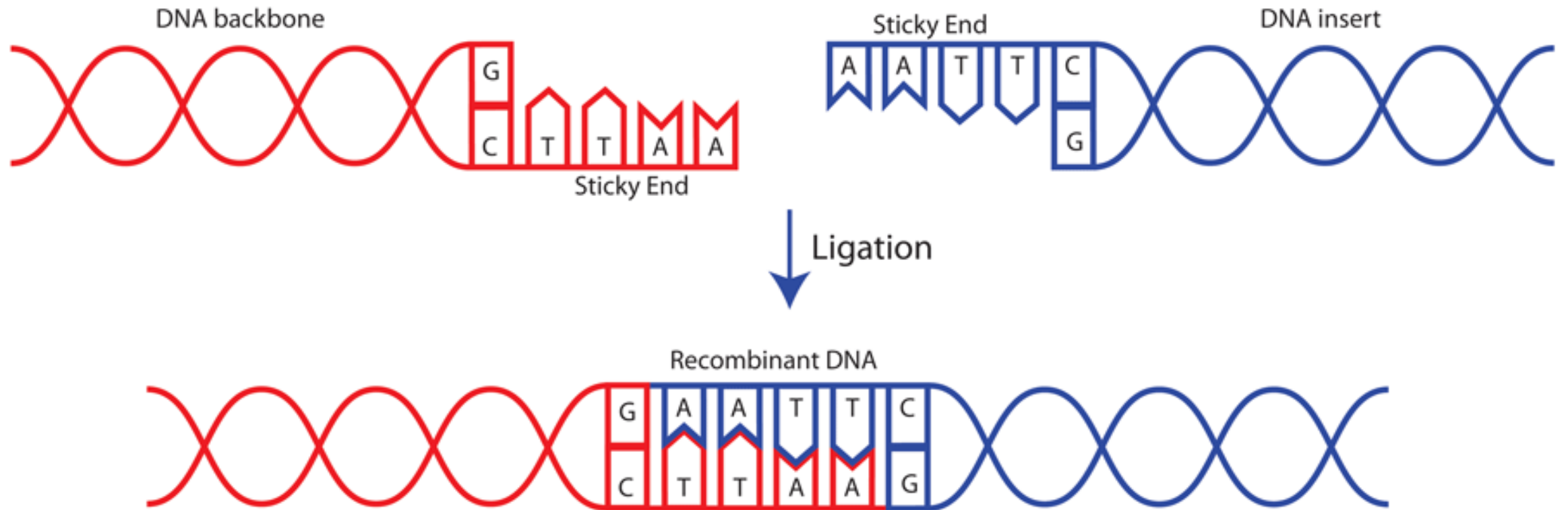
DNA recombinante



1: DNA Ligase – mecanismo de catálise



1: DNA Ligase - extremidades



1: DNA Ligase – perguntas importantes

Mas e extremidades cegas?

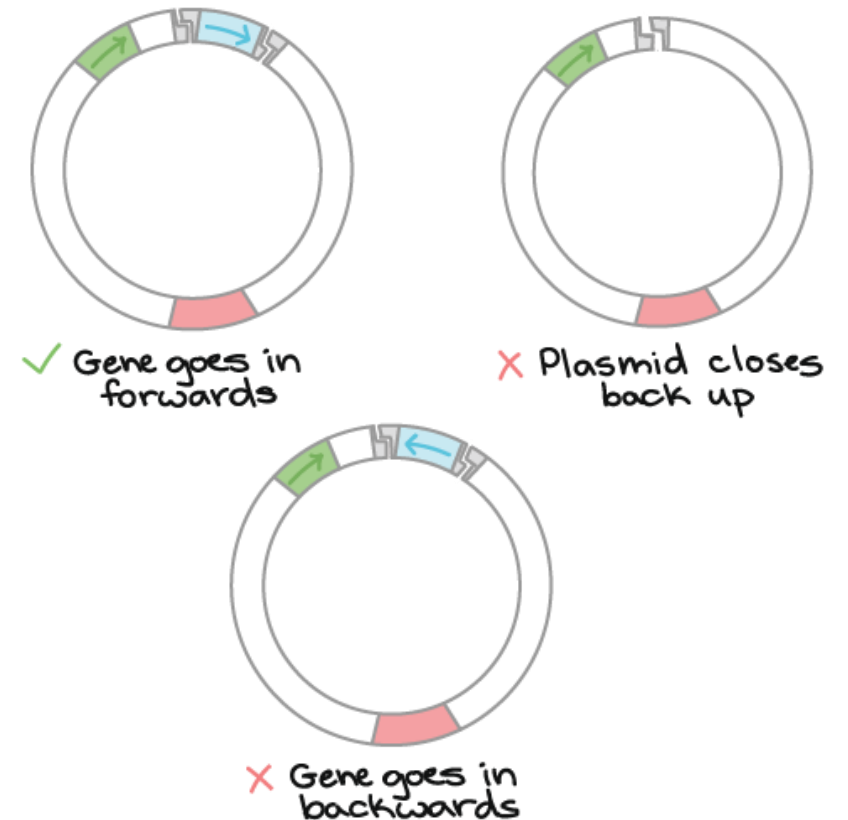
Liga também, mas menos eficiente
(extremidades ficam menos tempo próximas uma da outra para ligação)

E como prevenir o plasmídeo de re-ligar?

Desfosforilar vetor
Usar duas enzimas diferentes

E como prevenir o inserto de entrar virado?

Usar duas enzimas diferentes



1: DNA Ligase – o que tem no tubo?

Tampão (Tris pH 7.5, magnésio, DTT e ATP)

Inserto digerido e purificado

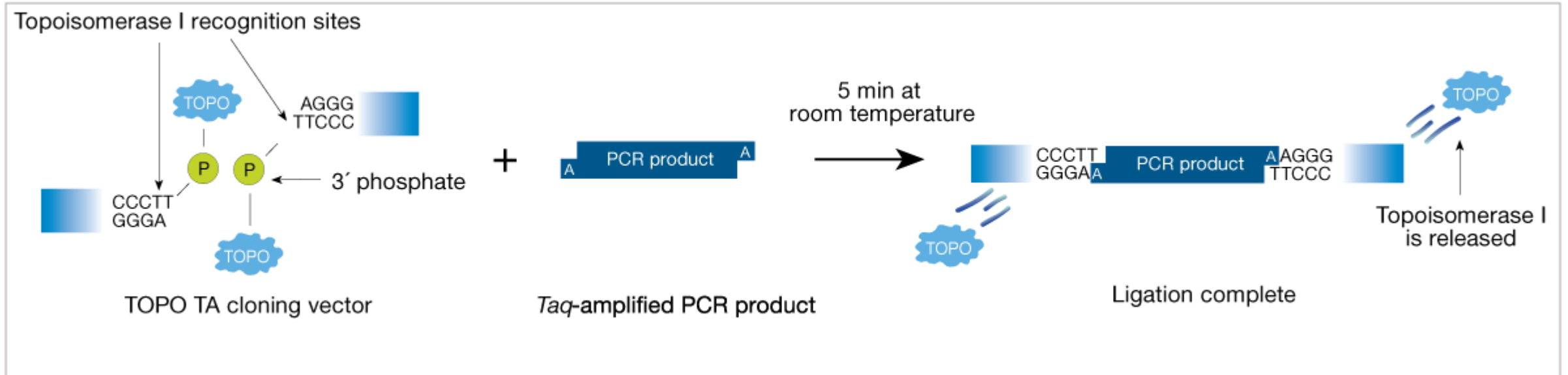
Vetor digerido e purificado

T4 DNA ligase

Água

*Temperatura: 4°C vs 16°C vs ambiente

2: TOPO cloning



Topoisomerase de vaccinia vírus tem sequência de reconhecimento específica – vetor já vem pronto (aberto)

Polimerase usada precisa colocar A no 3' do produto, se não fizer isso, pode incubar com Taq e dATP no final

Inserto vem direto do PCR – não pode ter fosfato 5' (enzima de restrição deixaria 5' P, mas primers do PCR não tem)

***Temperatura: ambiente**

2: TOPO cloning – perguntas importantes

Mas e extremidades cegas?

“TOPO blunt” – mesma Topoisomerase, mas não tem T no vetor

E como prevenir o plasmídeo de “re-ligar”?

Topoisomerase nas duas pontas previne isso

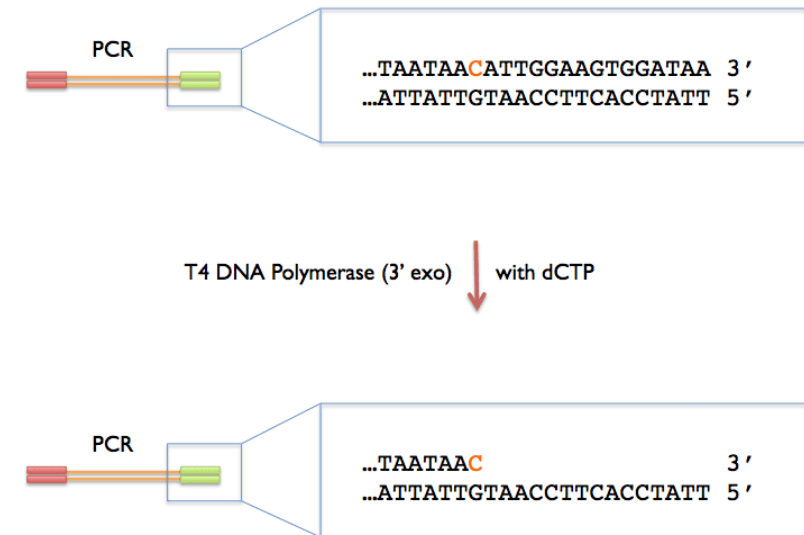
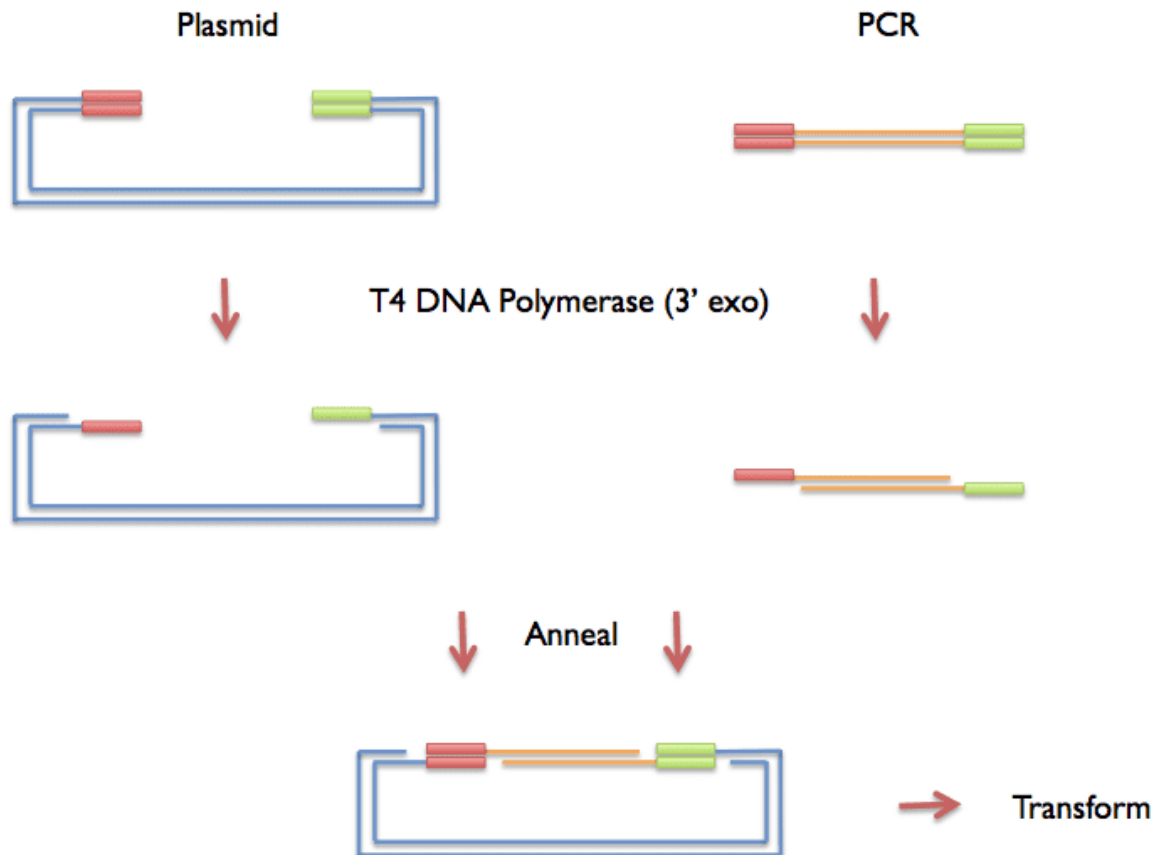
E como prevenir o inserto de entrar virado?

Não previne (até tem uma solução, mas não vem ao caso)

3: Ligation-independent cloning

Exonuclease da T4 polimerase gera região fita simples (em reações separadas para vetor e inserto)

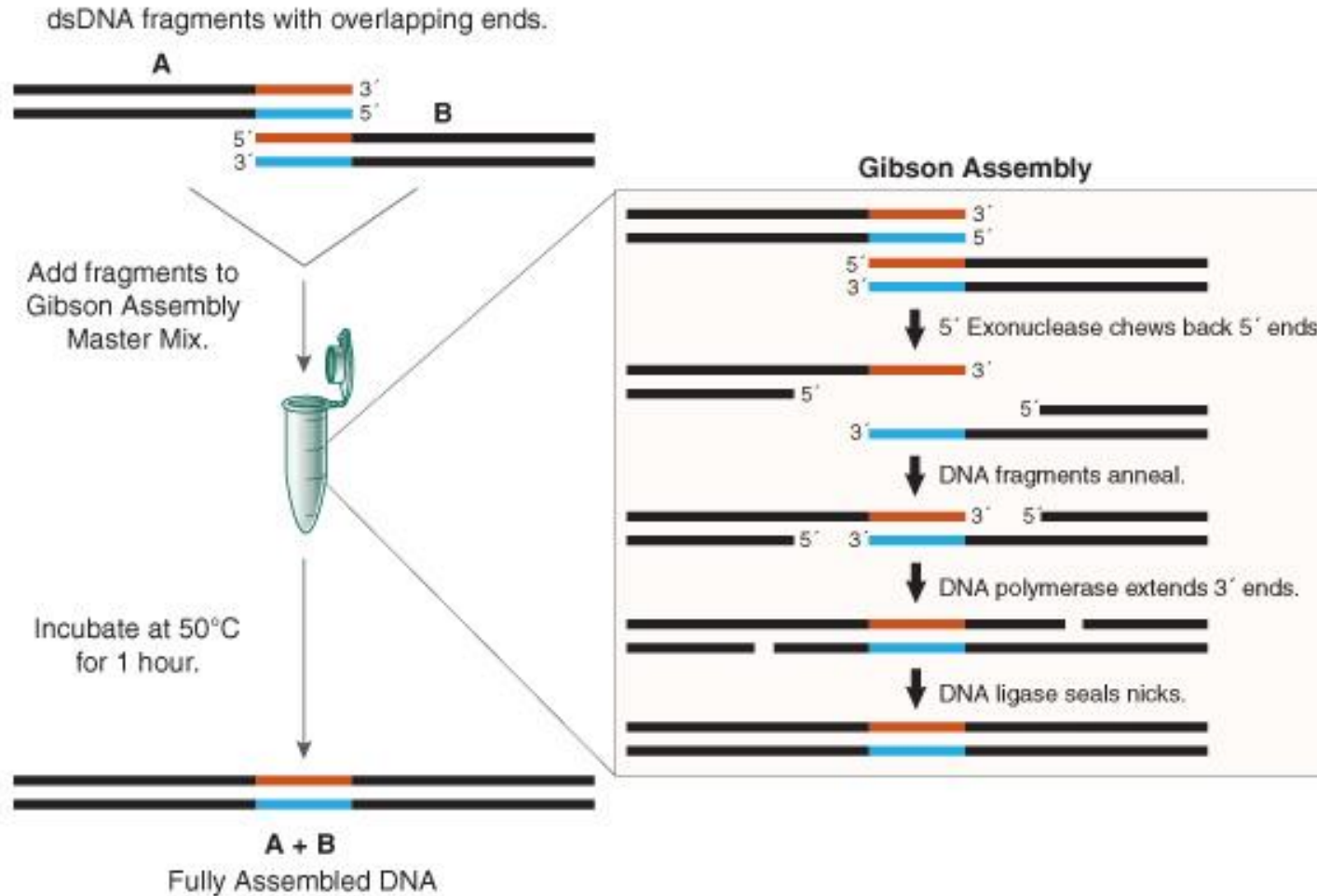
Inclusão de apenas um dos quatro dNTPs na reação restringe atividade polimerase ao primeiro par de base em que esse dNTP é incorporado
Pareamento mais extenso entre plasmídeo e inserto do que com enzima de restrição garante estabilidade da estrutura durante transformação
DNA anelado é reparado pela bactéria após a transformação



*Temperatura: ambiente

4: Gibson Assembly

Semelhante a LIC, mas atividade exonuclease e polimerase vem de enzimas diferentes e inclui ligação *in vitro* antes de transformar na bactéria
Não há a restrição de parar a exonuclease em um local específico, ocorre um equilíbrio entre as atividades
As três enzimas (exonuclease, polimerase e ligase) e os dois fragmentos de DNA estão no mesmo tubo a temperatura constante (50 °C)



Outros métodos:

Gateway cloning
Golden Gate cloning