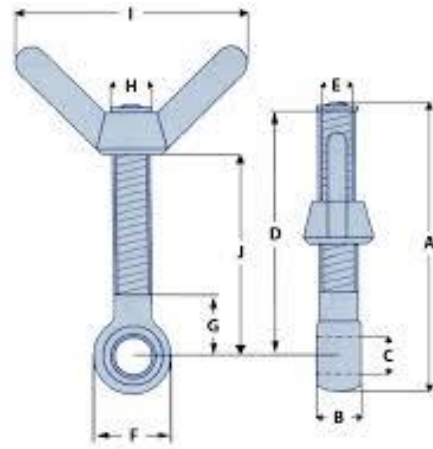
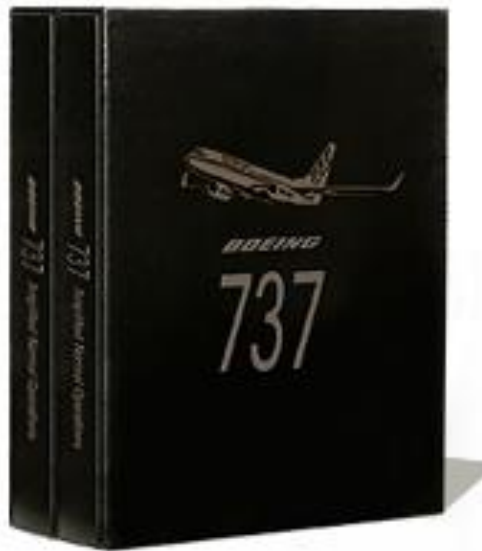
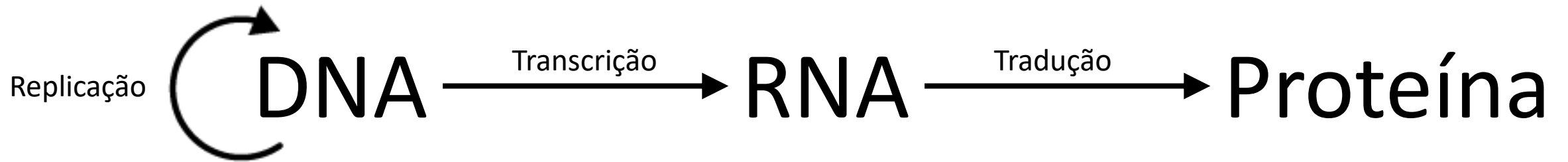


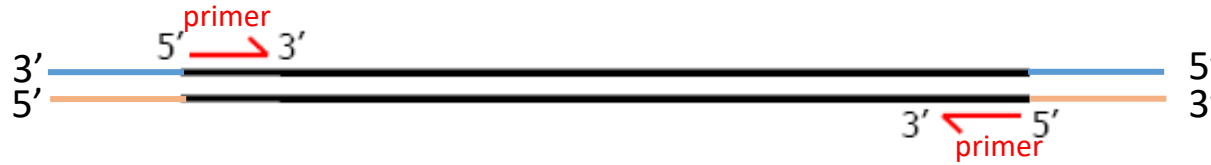
PCR
Clonagem molecular
Engenharia Genética/Transgênicos

QBQ0313 – Bioquímica (2023)

Nícolas Hoch

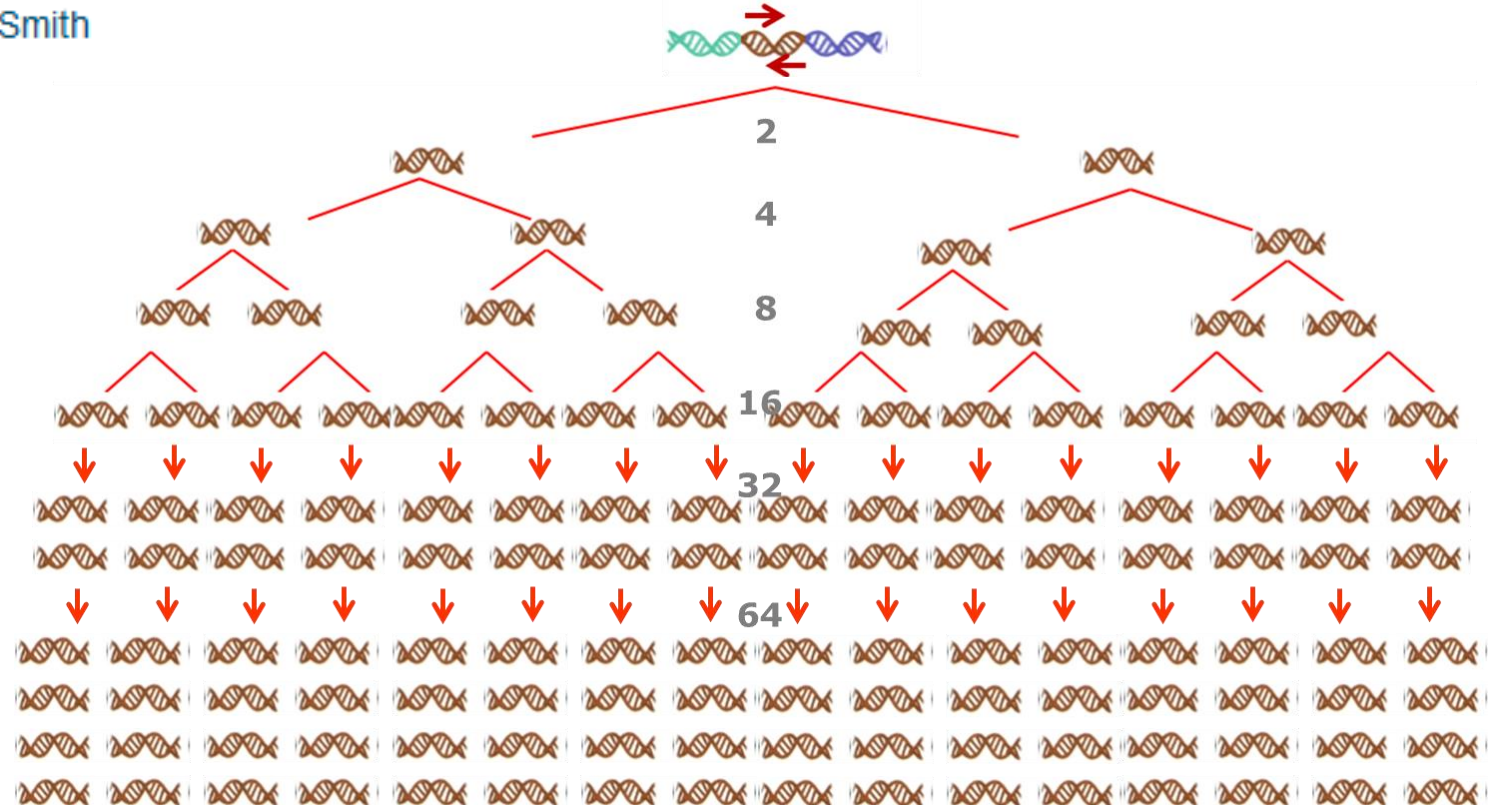


PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

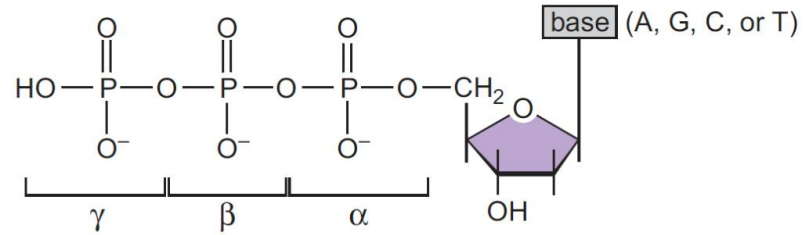


The Nobel Prize in Chemistry 1993

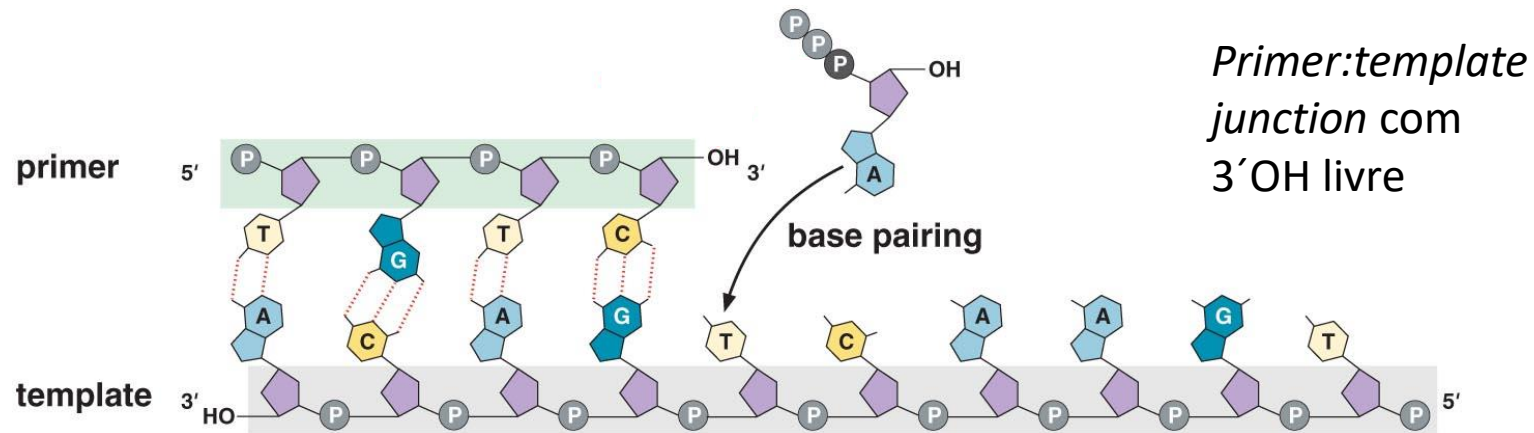
Kary B. Mullis, Michael Smith



A química da replicação - substratos

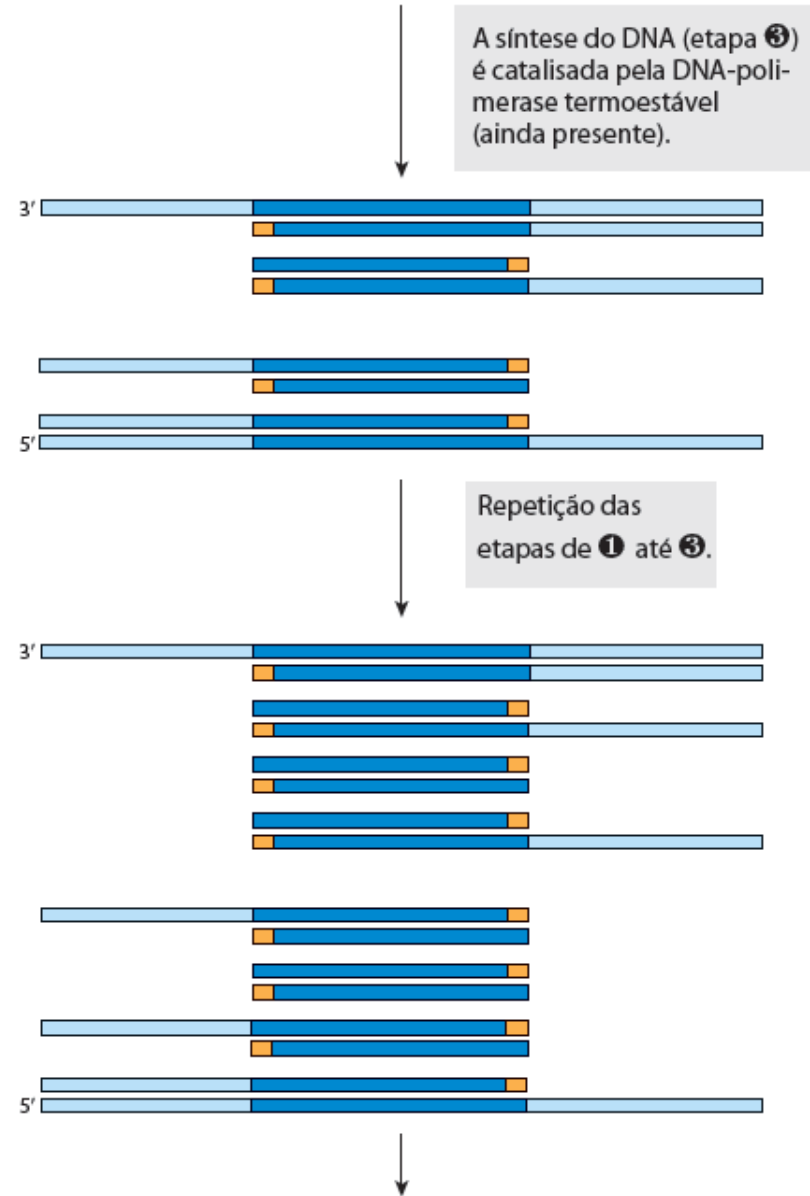
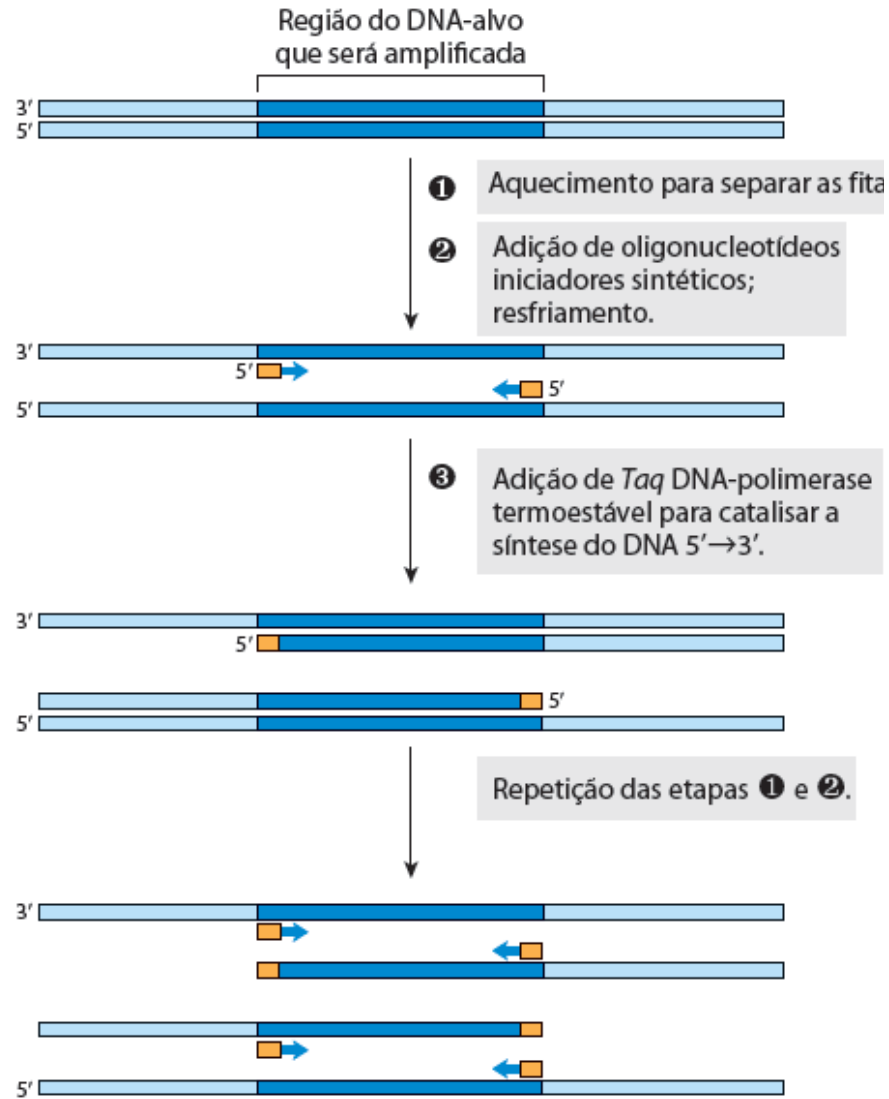


dNTPs



Pareamento de base com molde é que seleciona nucleotídeo a ser incorporado !

(a)

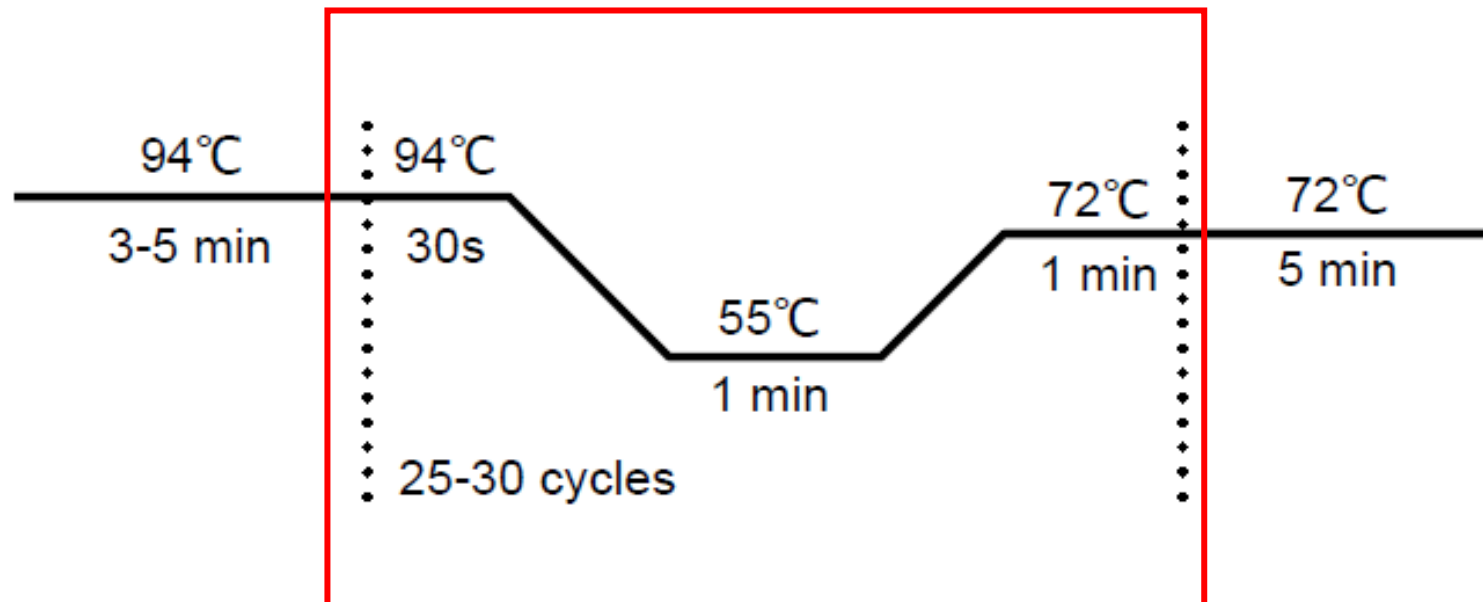


Após 20 ciclos, a sequência-alvo foi amplificada em cerca de 10^6 vezes.

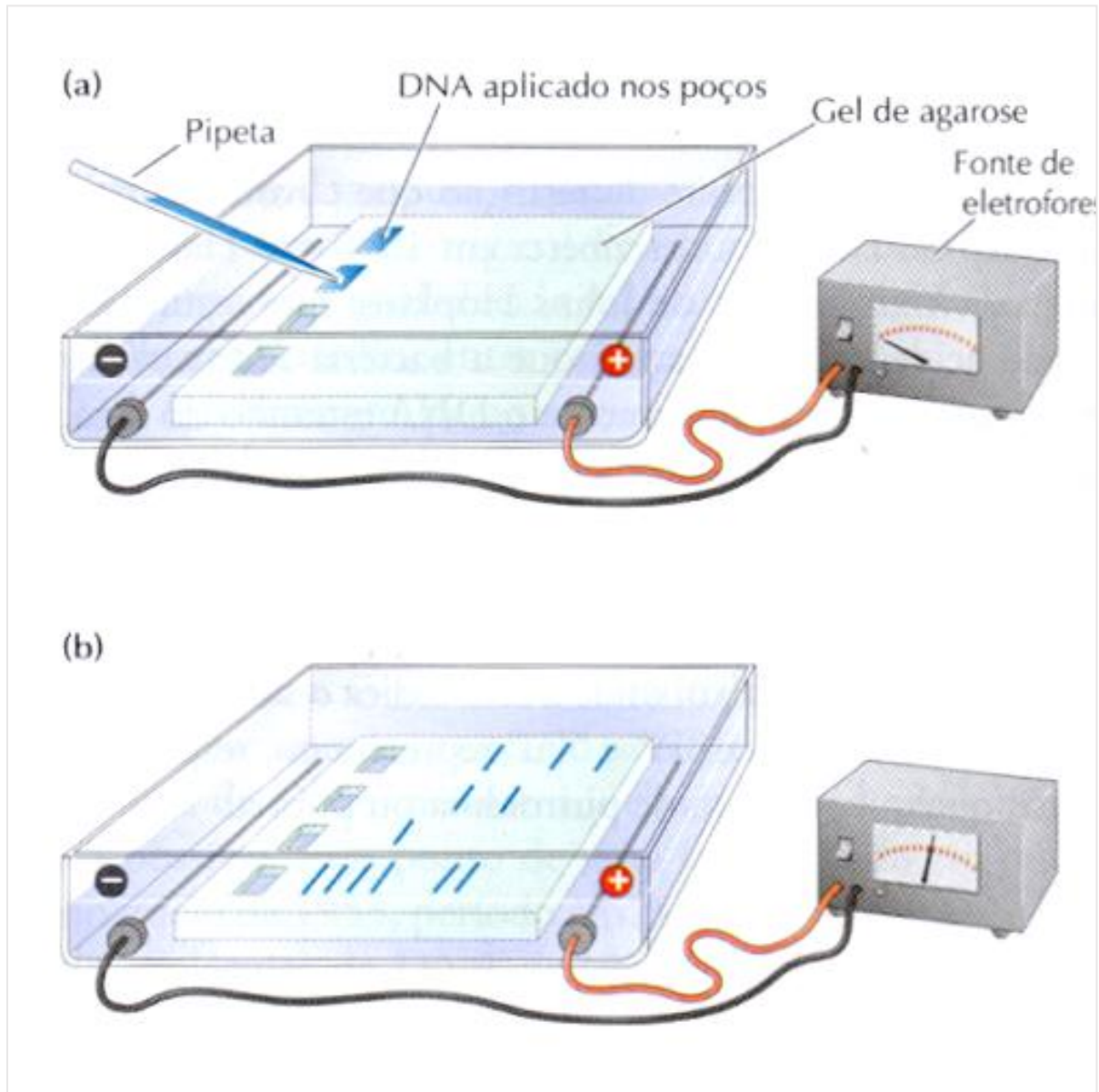
Cada **ciclo** da PCR tem três etapas:

- | | | |
|----------------------------------|--|--------------------------|
| 1. <u>Desnaturação</u> | 94°C | 30 secs – 30seg |
| 2. <u>Anelamento</u> | 55°C
<i>depende da Tm do primer</i> | 1min |
| 3. <u>Extensão/Polimerização</u> | 72°C | 1min para cada 1000bases |

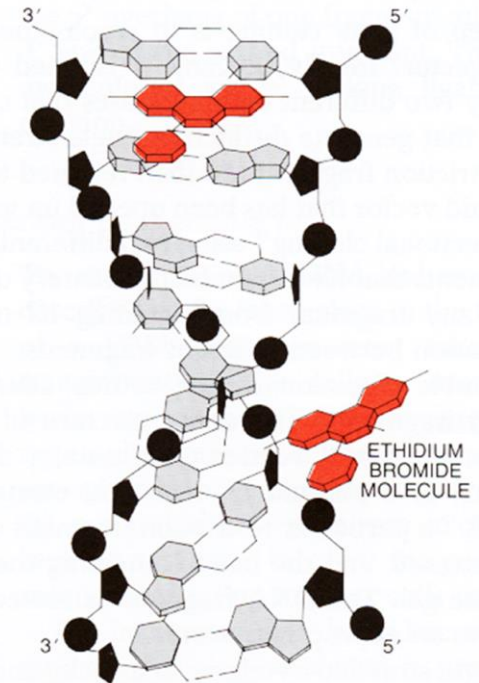
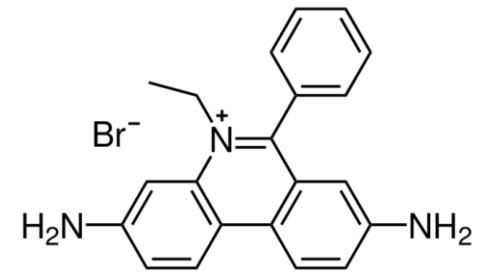
DNA polimerase para PCR tem que ser termoestável!



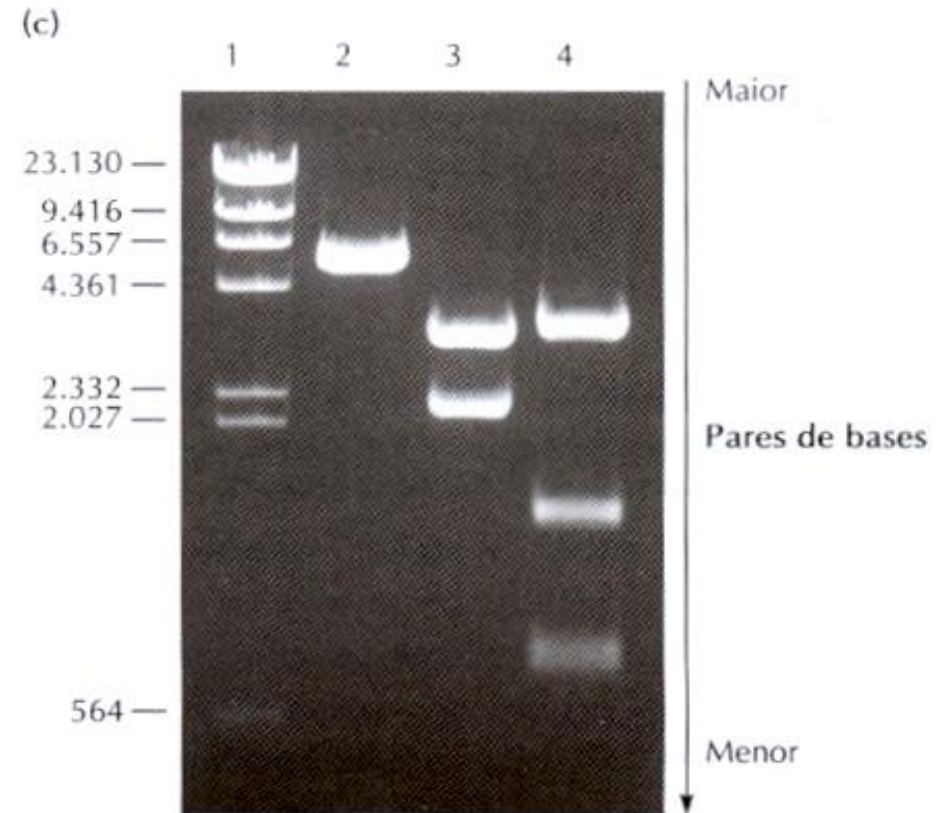
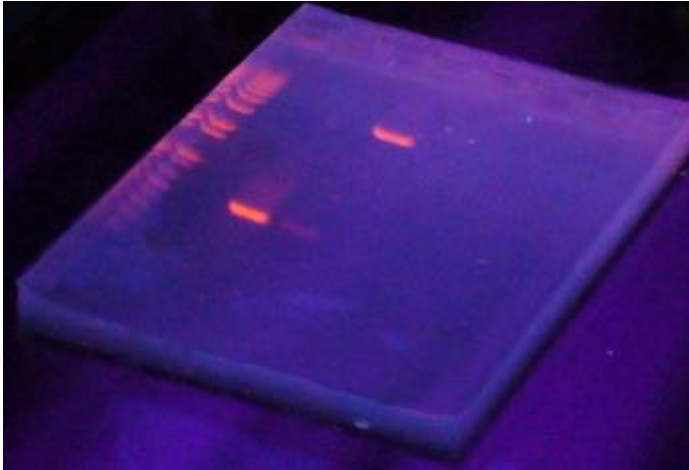
Eletroforese em Gel de Agarose



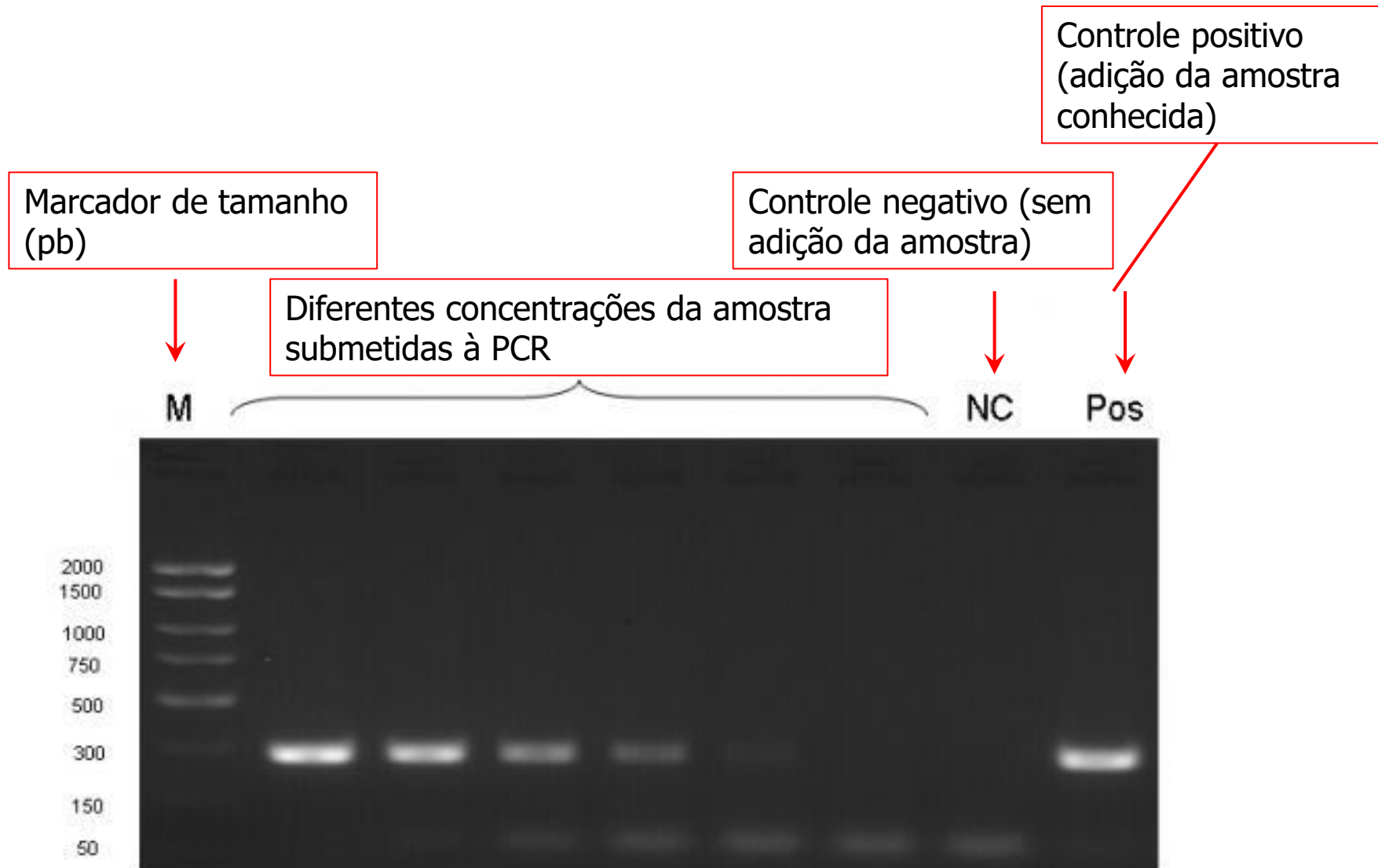
Brometo de Etídio



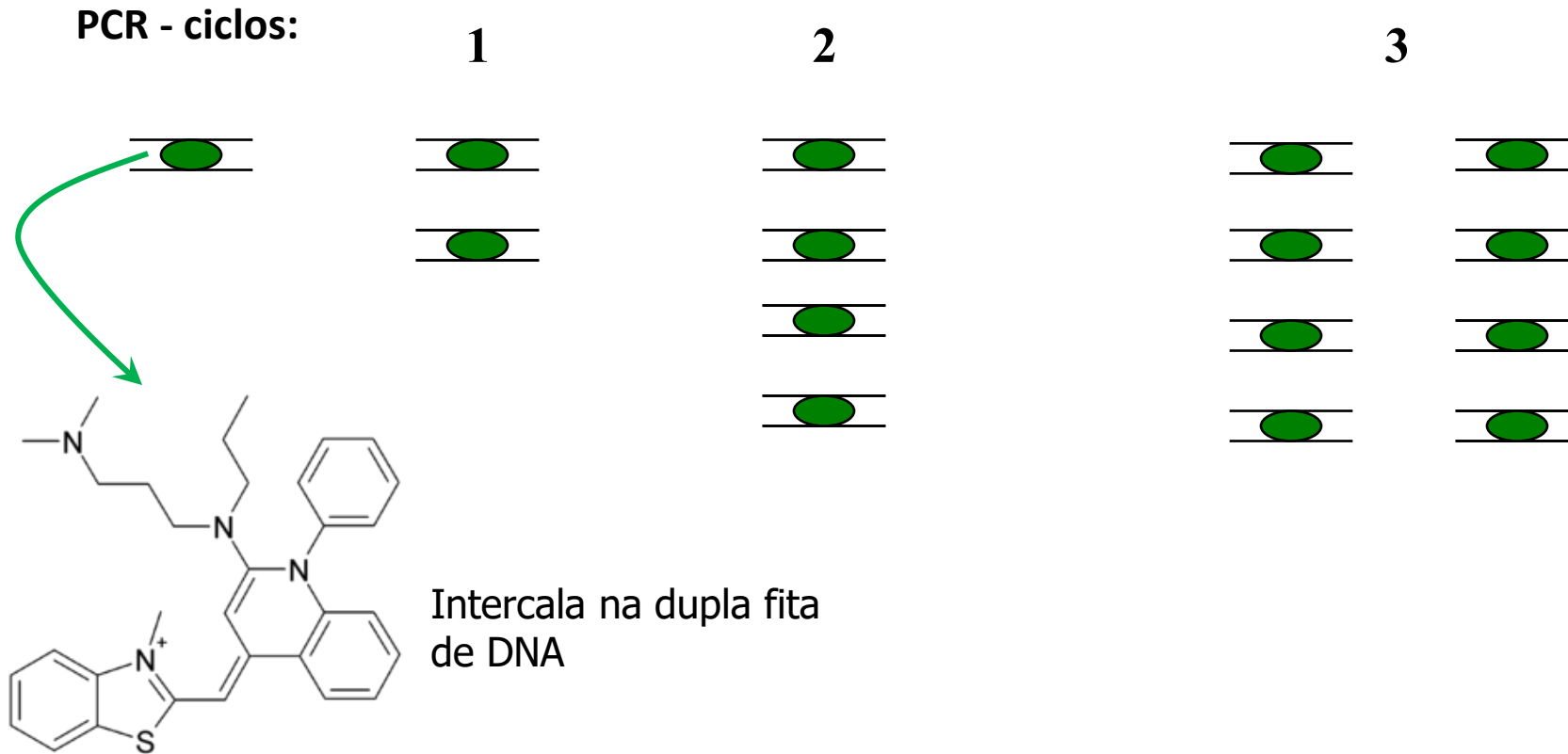
Eletroforese em Gel de Agarose



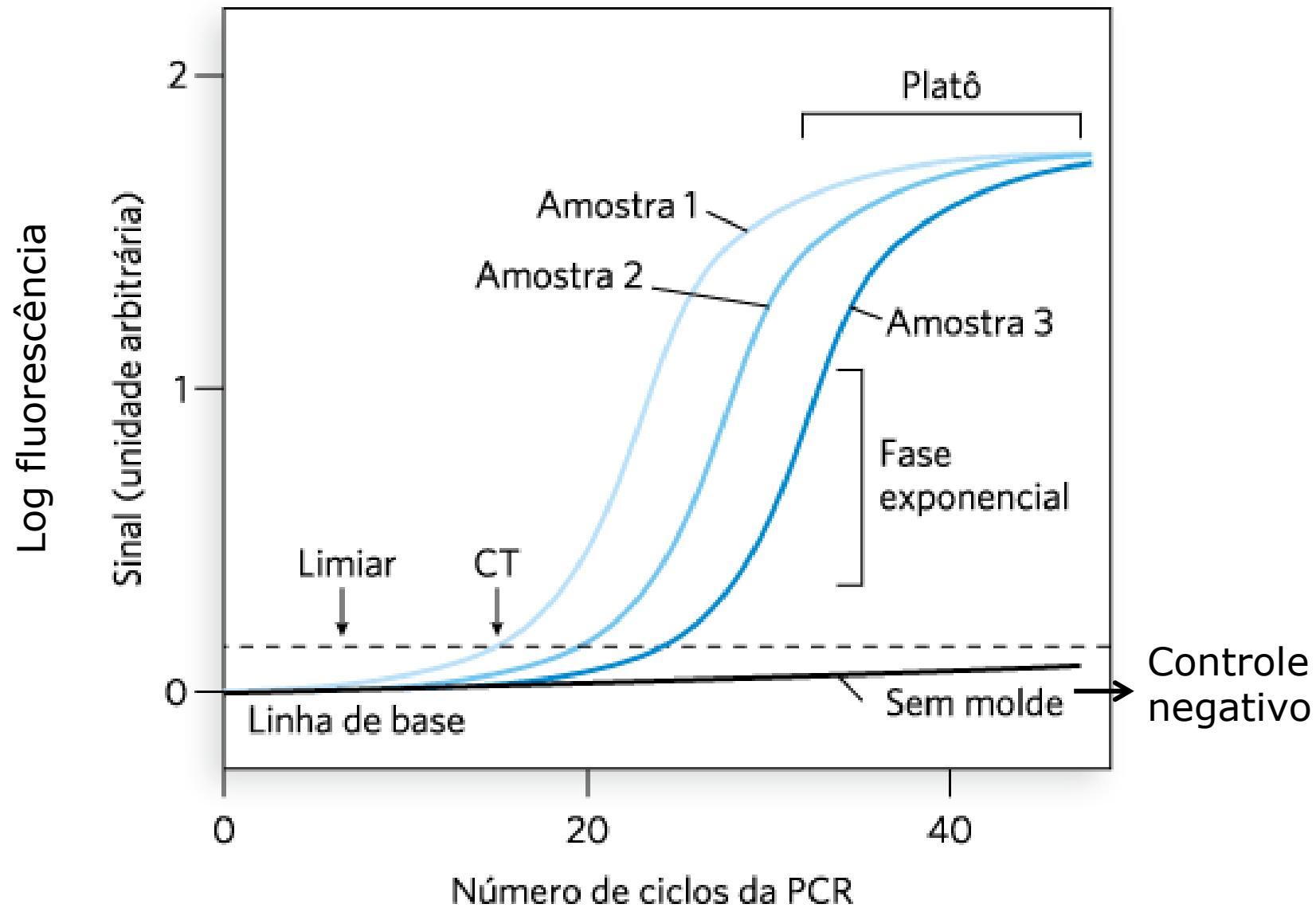
PCR convencional é semi-quantitativo



"Real-time PCR": Detecção dos produtos de PCR com fluoróforo Sybr Green



A fluorescência do Sybr Green é proporcional à quantidade de produto de PCR gerado



C_T – (Cycle Threshold) = Número de ciclos em que a fluorescência detectada ultrapassa o limite da fluorescência basal (*threshold*)

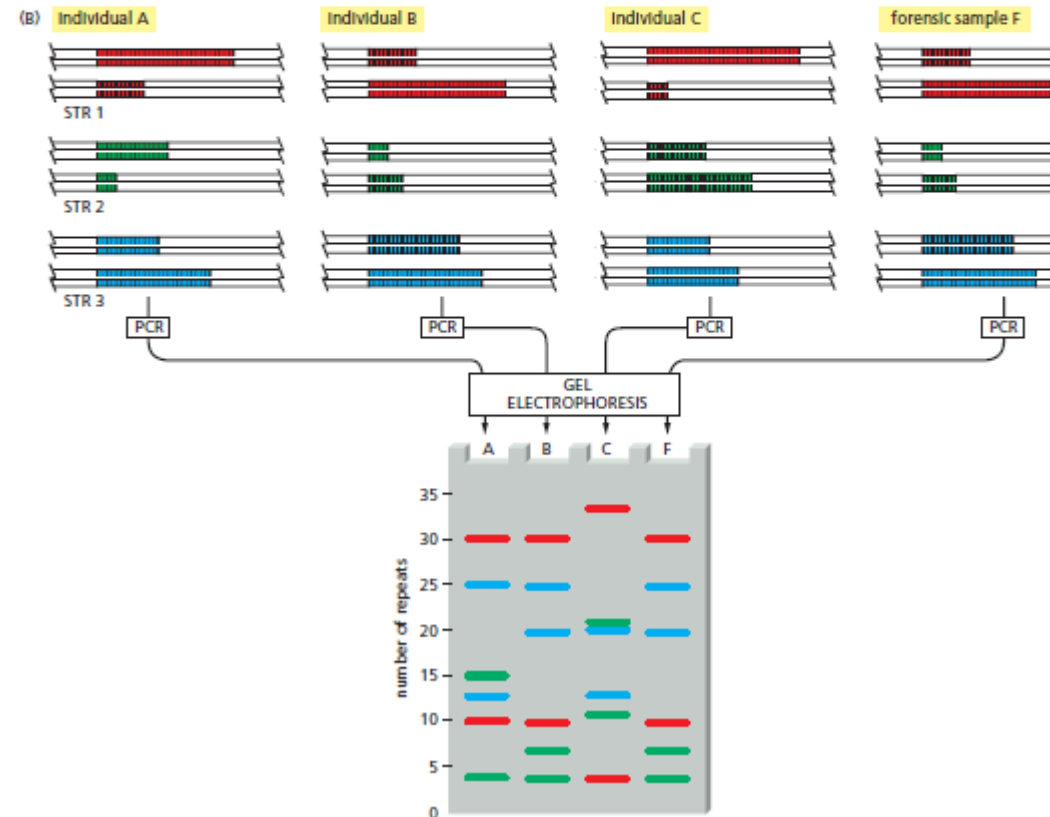
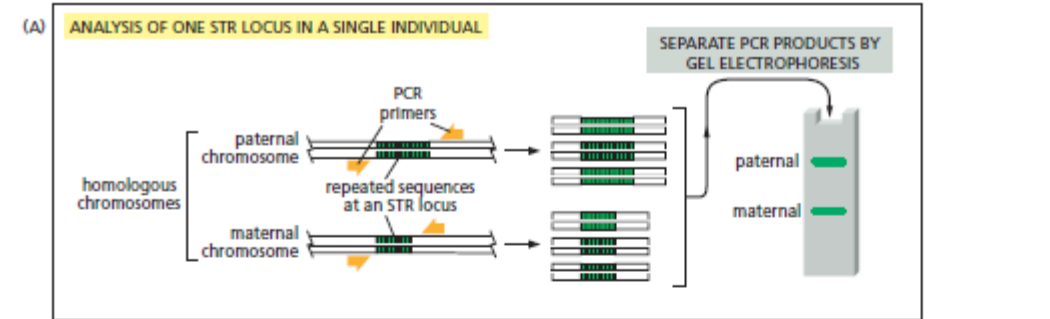
Aplicações

Diagnóstico de doenças infecciosas
(exemplo: RT-PCR para COVID19)

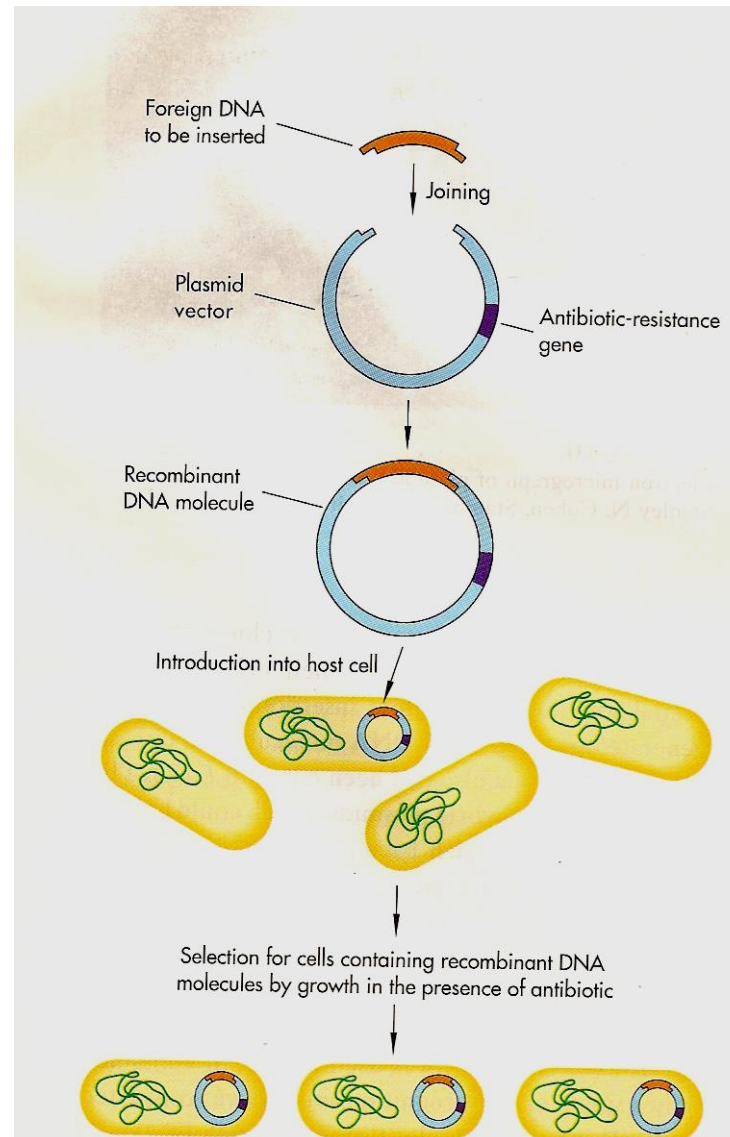
Testes de DNA (paternidade e forense)



Clonagem Molecular (a seguir)



Tecnologia do DNA recombinante



O que é (e o que não é) **DNA recombinante**?

Molécula de DNA (nova – inexistente na natureza) gerada pela junção de duas ou mais moléculas de DNA de fontes (e geralmente organismos) diferentes

“Re-combinar” no sentido de combinar moléculas de uma maneira diferente

* Diferente de recombinação homóloga, que é uma via de reparo de DNA

O que é **Clonagem**?

Processo que gera cópias idênticas de algo:

- DNA (clonagem molecular – essa disciplina!)
- células (isolamento ou seleção de uma célula com dada característica)
- organismos (Dolly!)



Photo from the Nobel
Foundation archive.

Paul Berg

Prize share: 1/2



Photo from the Nobel
Foundation archive.

Walter Gilbert

Prize share: 1/4



Photo from the Nobel
Foundation archive.

Frederick Sanger

Prize share: 1/4

The Nobel Prize in Chemistry 1980 was divided, one half awarded to Paul Berg "for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA", the other half jointly to Walter Gilbert and Frederick Sanger "for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids"

Mas porque foi (e ainda é!) tão importante?

Pesquisa básica:

- Identificar genes (triagem)
- Estudar função de genes e/ ou do RNA
ou proteína que codificam
- Expressar proteínas para ensaios bioquímicos
- Determinar estrutura da proteína
- Sequenciamento
-

Biotecnologia:

- Insulina e hormônio do crescimento
- Transgênicos e engenharia genética
- Uso forense e teste de paternidade
-

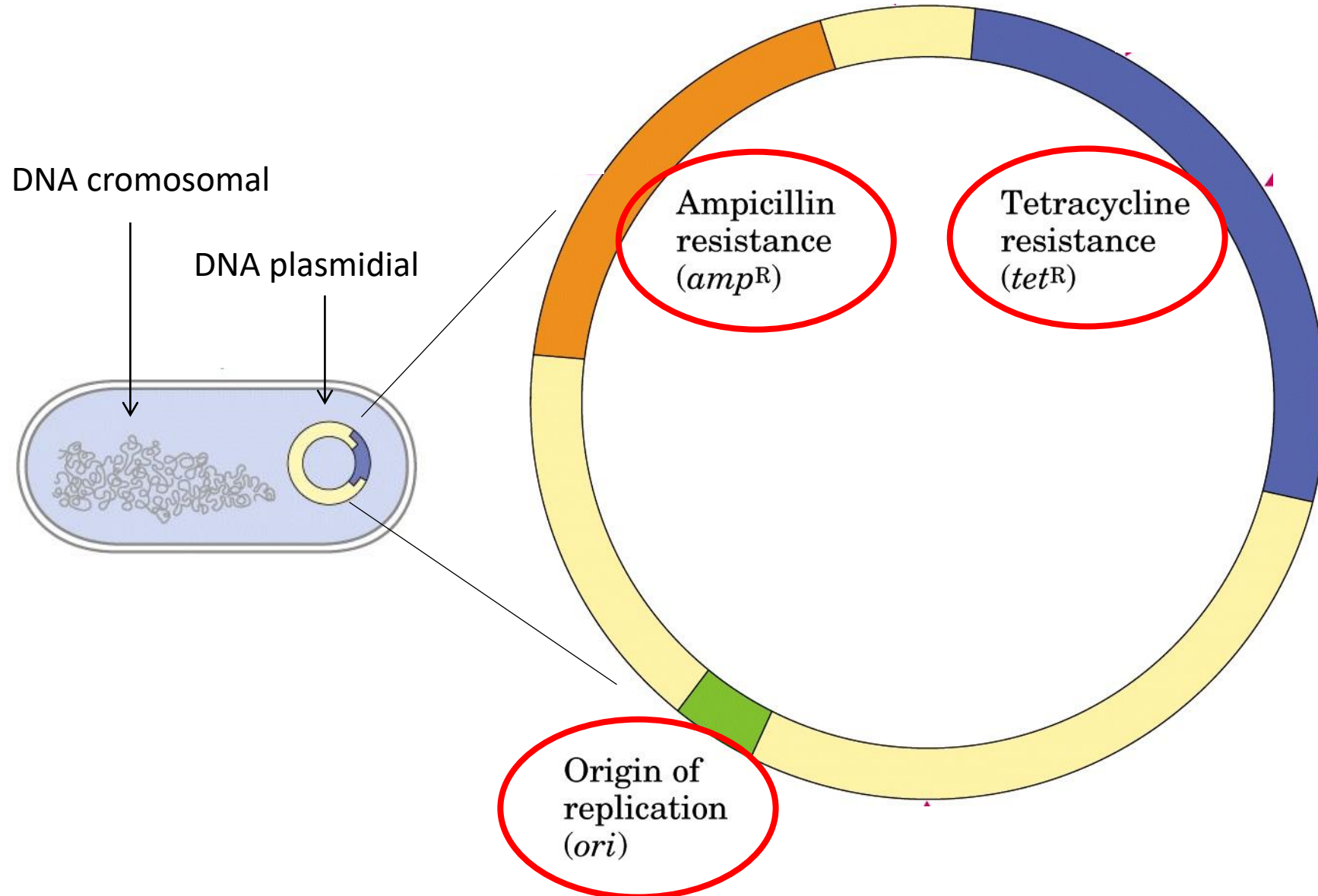
Clínica:

- Diagnóstico de microrganismos
- Diagnóstico de doenças genéticas
- Terapia gênica
-

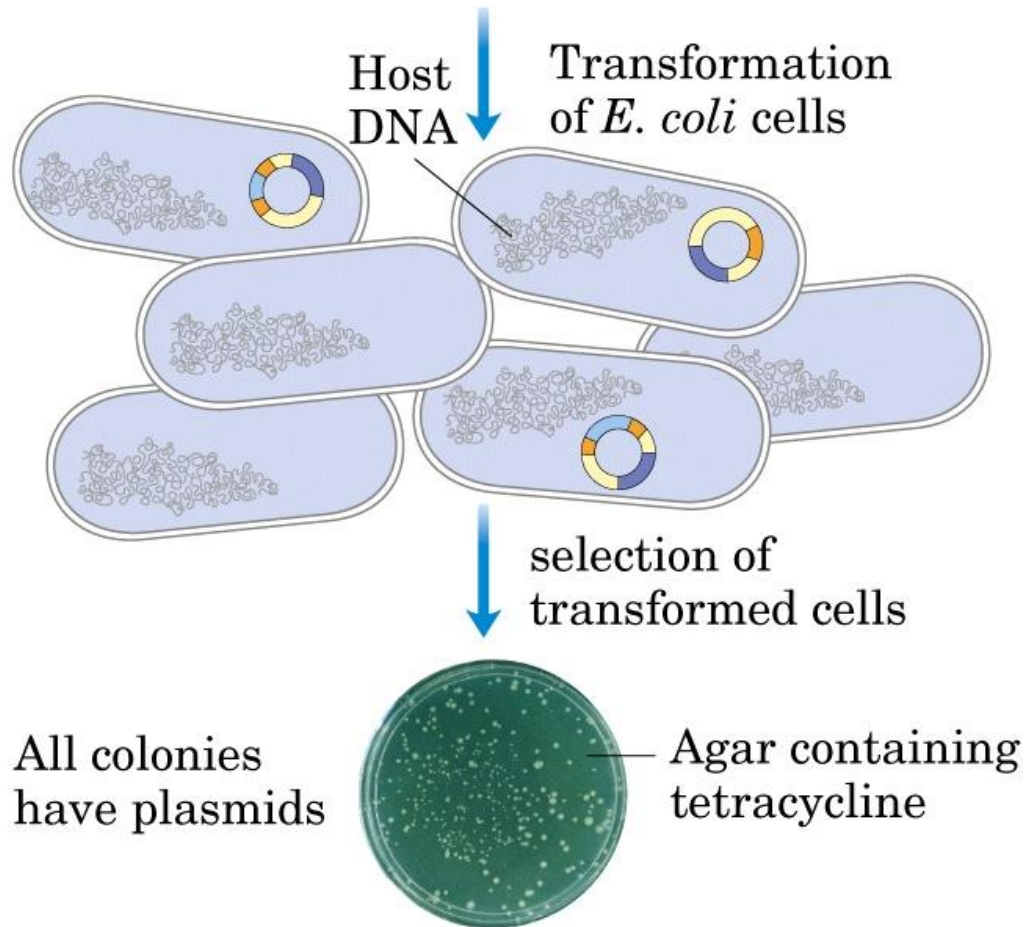
Como “re-combinar” DNA?

- Uma forma de obter o DNA que desejamos clonar (PCR)
- Uma forma de cortar DNA
- Uma forma de ligar o inserto em outro DNA
- Uma sequência de DNA “receptora” adequada
- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nova molécula gerada

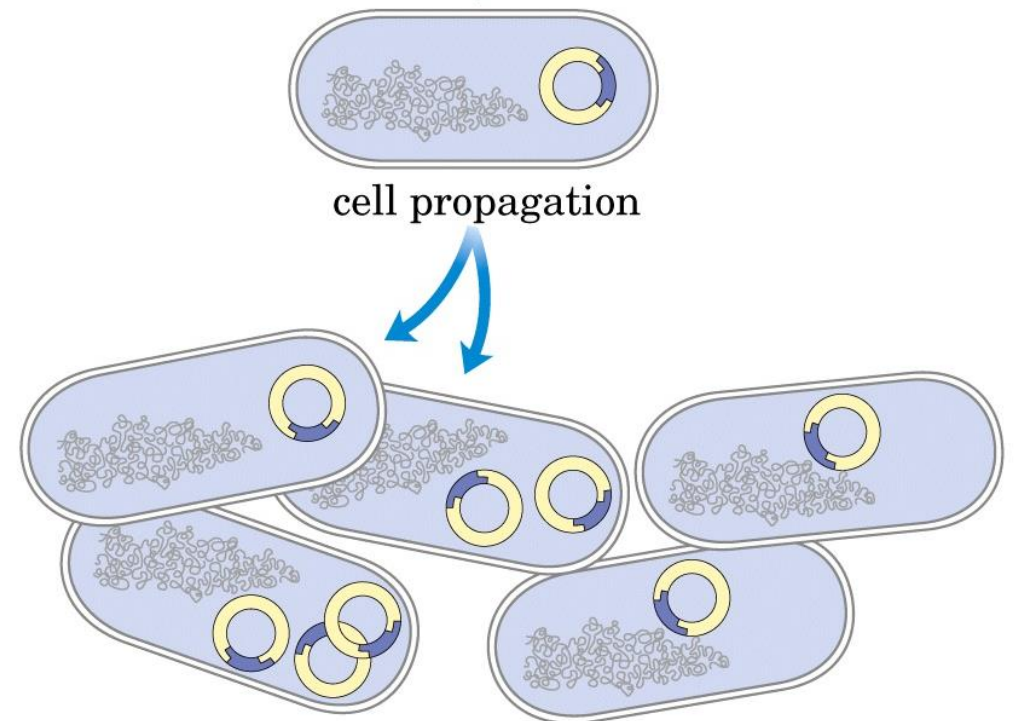
Plasmídeos



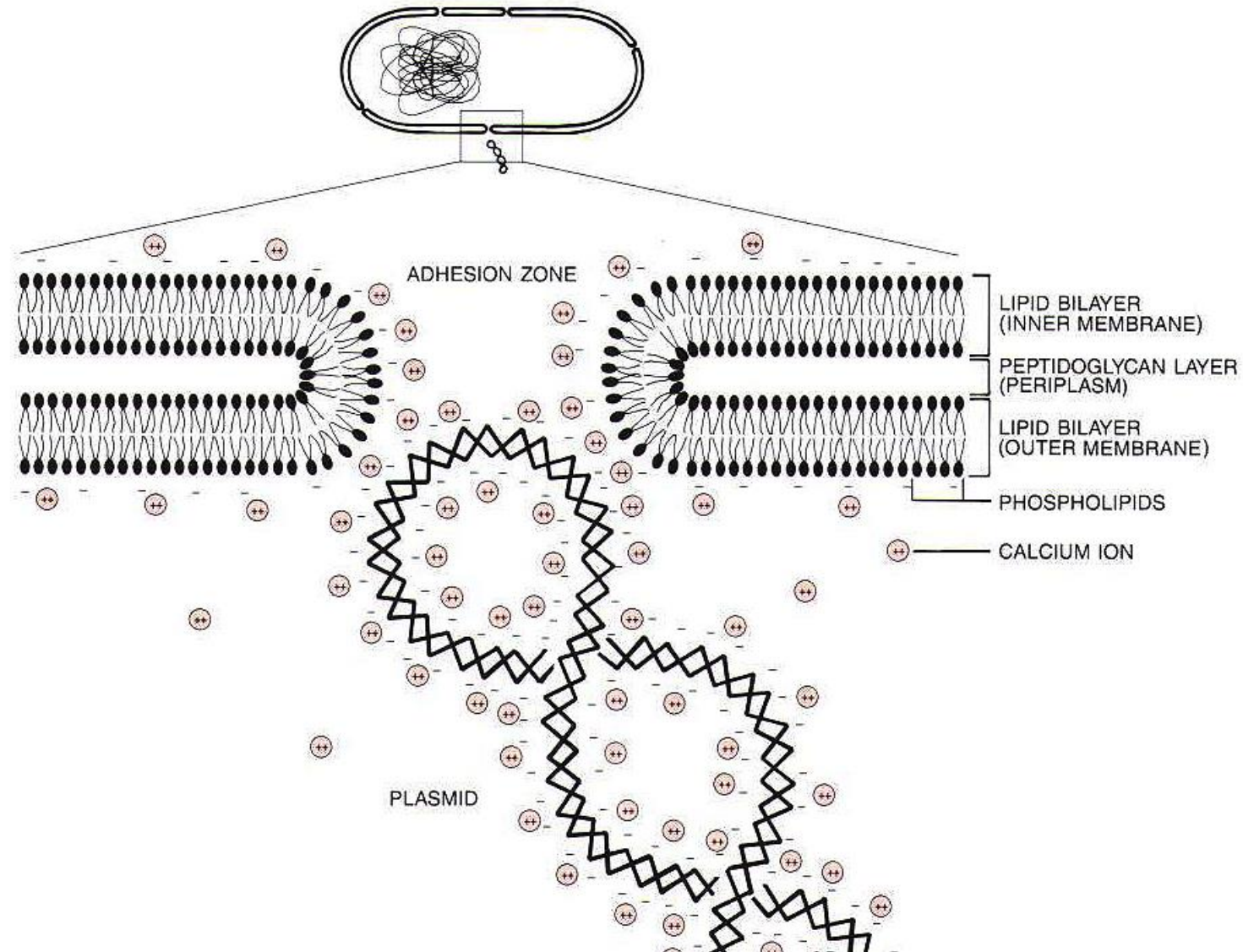
Resistência a antibiótico permite selecionar as células que receberam o plasmídeo



Origem permite que bactéria faça cópias do plasmídeo




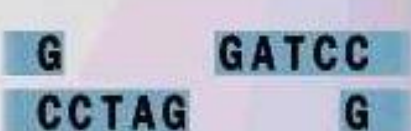

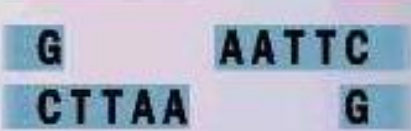





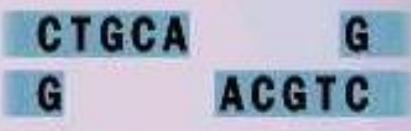


Transformação de bactérias



Como “re-combinar” DNA?

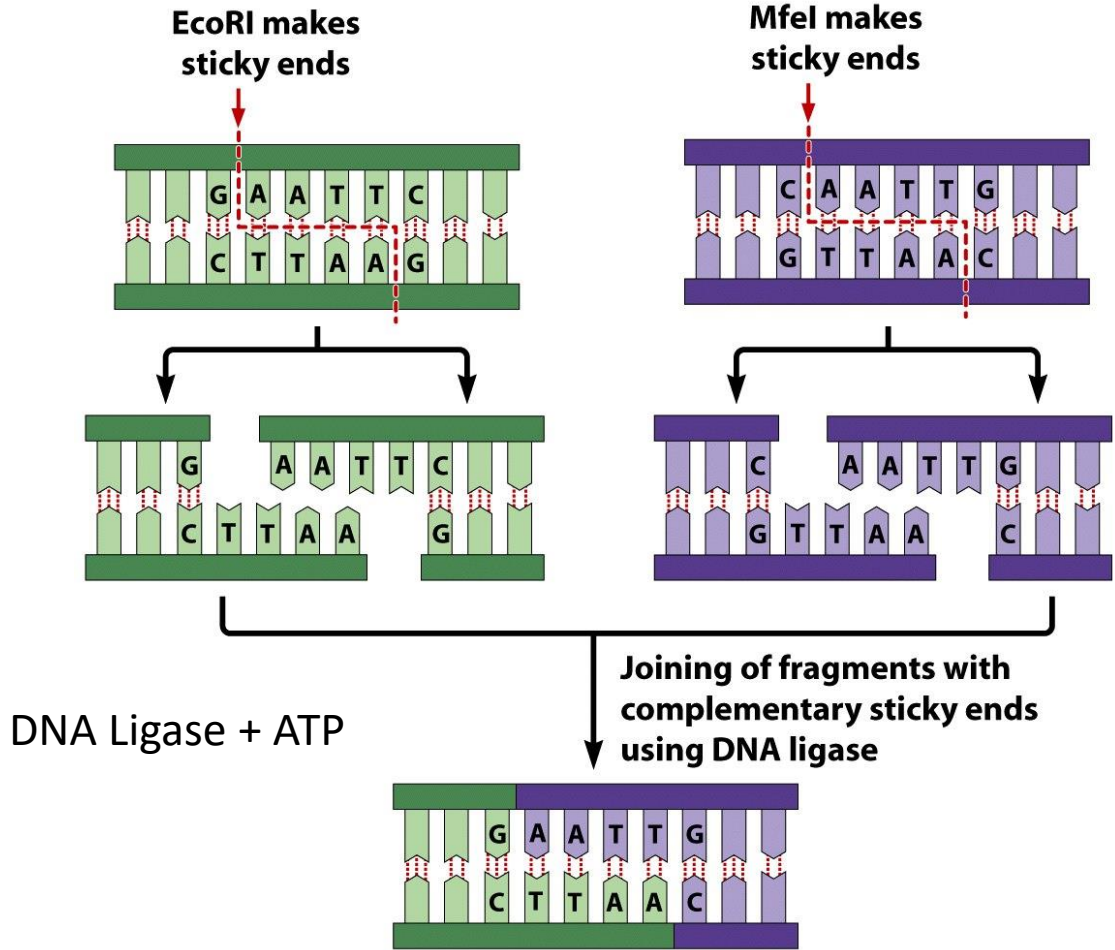
- Uma forma de obter o DNA que desejamos clonar (PCR)
- Uma forma de cortar DNA
- Uma forma de ligar o inserto em outro DNA
- Uma sequência de DNA “receptora” adequada
- Uma maneira de fazer cópias (clones) da nova molécula gerada

Enzimas de Restrição

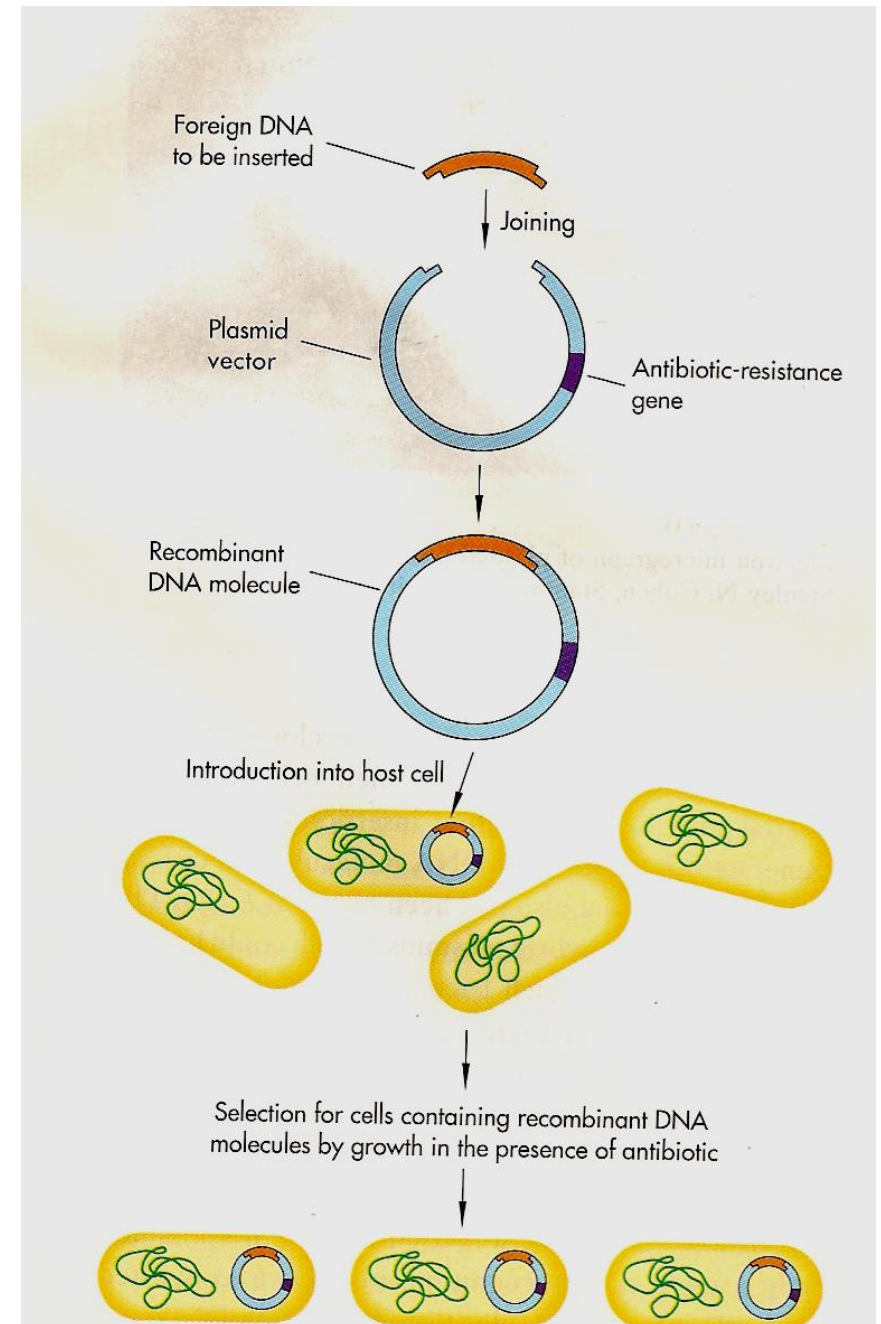
<i>Enzima</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Produto</i>
<i>Bam</i> HI		
<i>Eco</i> RI		
<i>Hind</i> III		
<i>Hae</i> III		
<i>Pst</i> I		
<i>Sma</i> I		

- Reconhecem sequências palindrômicas
- Geram quebras de fita dupla
- Podem gerar extremidades cegas ou coesivas
- Origem bacteriana (*Eco*RI = *E.coli*;
*Bam*HI= *Bacillus amyloliquefaciens*)

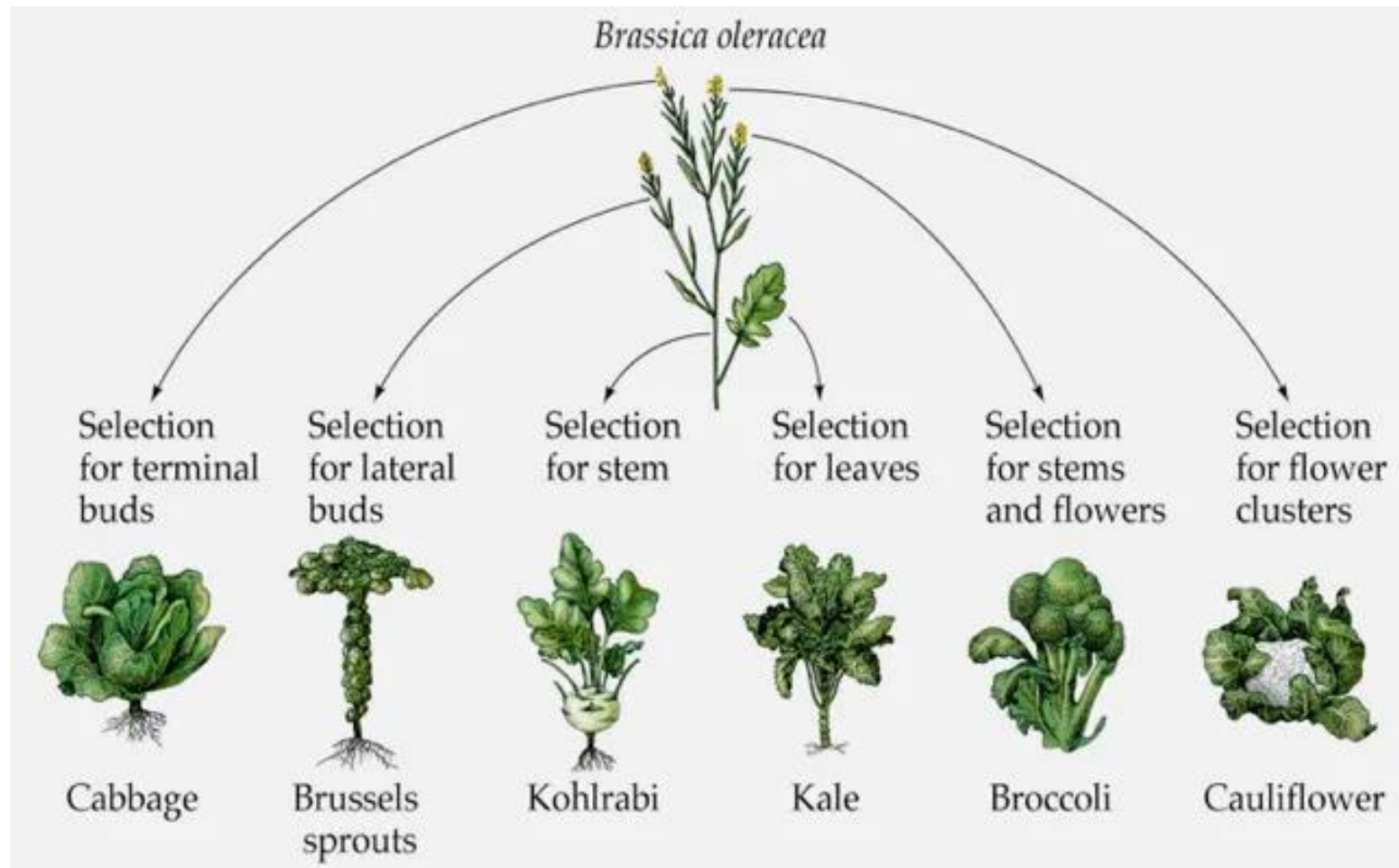
Ligação



1. Cortar plasmídeo com enzima de restrição para abrir
2. PCR para amplificar o gene de interesse a partir do DNA de origem
3. Ligar inserto (gene de interesse) no plasmídeo
4. Transformar bactéria para receber esse DNA
5. A bactéria faz cópias do plasmídeo
(selecionar bactérias que tem plasmídeo com antibiótico)
- 6a. Purificar plasmídeo da bactéria
e transferir o DNA para espécie de interesse
- 6b. Expressar proteína de interesse na bactéria e purificar a proteína



Reprodução seletiva vs transgenia

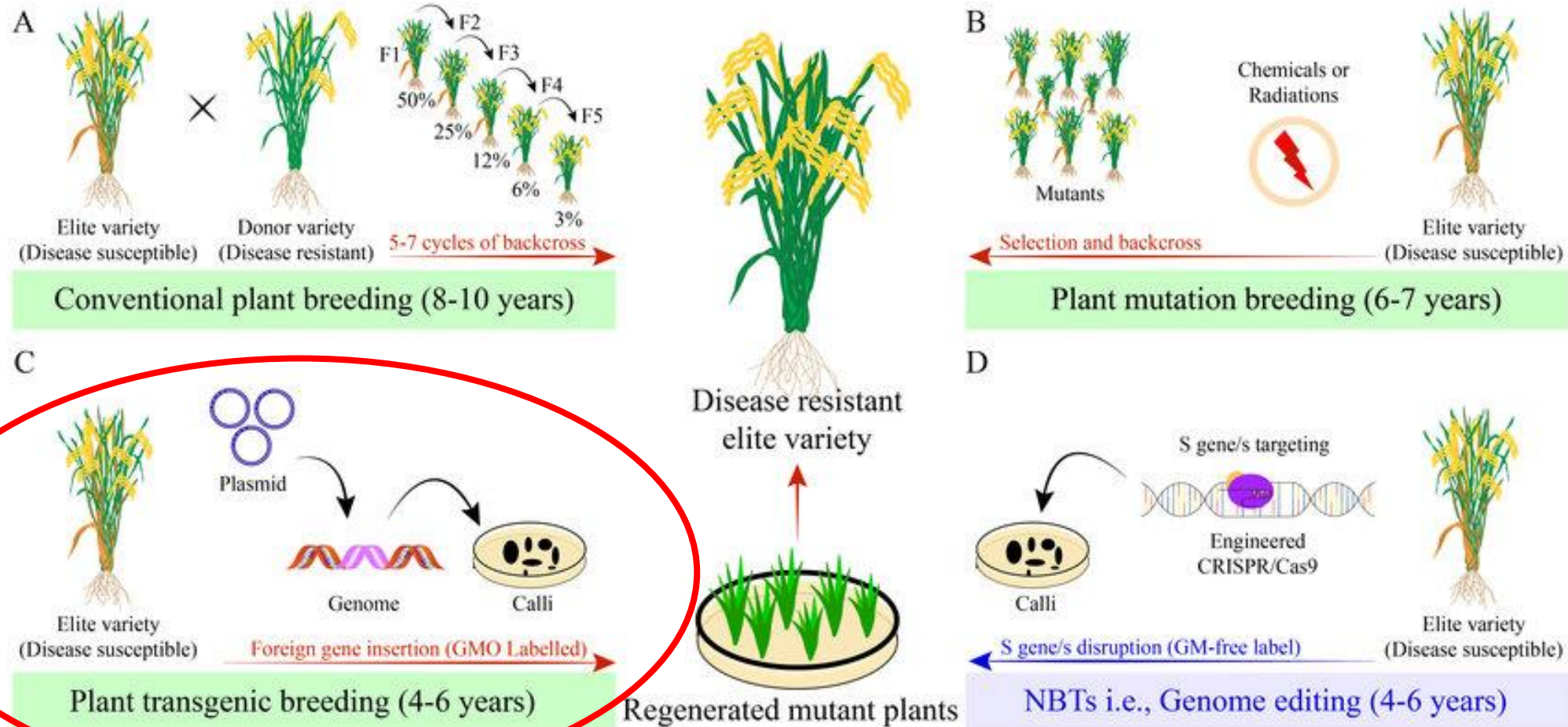


Métodos de melhoramento genético

Ahmad et al., 2020

<https://doi.org/10.1093/bfpg/elz041>

Briefings in Functional Genomics



Apenas este é um transgênico (TRANSgenia = inserção de um gene de outra espécie)

Exemplos

Soja/milho/canola resistente a herbicida por introdução de um gene de resistência vindo de uma bactéria
-> permite usar um herbicida só (ao invés de vários) para controlar ervas daninhas

Milho/algodão contendo gene de resistência (vindo de uma bactéria) para impedir crescimento de insetos
-> permite reduzir o uso de pesticidas

“Golden Rice” – Arroz que contém dois genes (um de narcisos, outro de bactéria) para síntese de Vitamina A
-> aumenta o valor nutricional



Muito outros exemplos, basicamente para

- Resistência a herbicida
- Resistência a alguma praga (inseto ou vírus)
- Tolerância a calor ou falta de água/aumento da produtividade/redução da área plantada
- Melhorar valor nutricional



- Em março de 2005, foi aprovada pelo Congresso Nacional a Lei da Biossegurança, essa Lei tem o objetivo de proteger a diversidade e a integridade do patrimônio genético do país, ou seja, um conjunto de medidas destinadas à prevenção de riscos em processos de pesquisas, serviços e atividades econômicas que possam garantir a saúde humana e evitar impactos negativos ao meio ambiente. **A Lei da Biossegurança funciona através da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CNTBio, do Ministério da Ciência e Tecnologia. No Brasil, é crime liberar no ambiente OGMs sem autorização da CTNBio.**

A CTNBio é a instituição responsável em proteger a diversidade e integridade do patrimônio genético brasileiro pelo estabelecimento de normas de segurança e de pareceres técnicos relativos que autorizam ou não testes de campo, produção e comercialização de OGMs.

Controvérsias

Efeitos sobre saúde?

Efeitos sobre ambiente?

Efeitos econômicos?