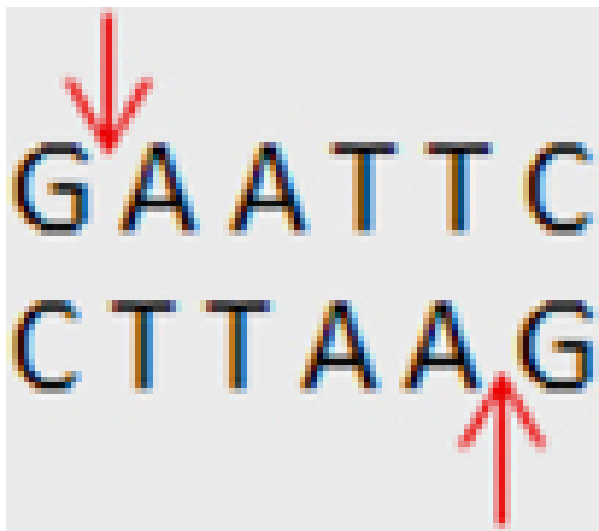
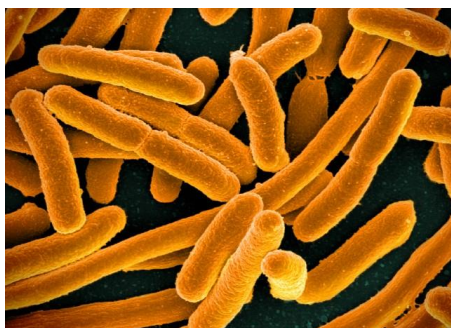
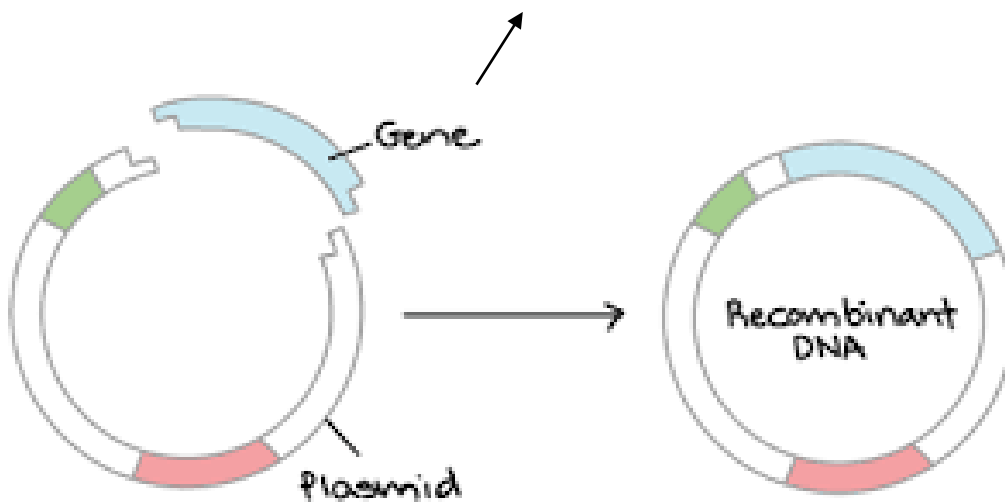


QBQ 136 Biologia Molecular

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE



DNA Recombinante são moléculas de DNA geradas no laboratório através da fusão de fragmentos de DNA derivados de duas ou mais fontes, geralmente de espécies diferentes.



São procedimentos centrais na tecnologia do DNA recombinante:

- Cortar o DNA com **enzimas de restrição**;
- Ligar o DNA com **DNA ligase**;
- Clonar o DNA (utilizando-se vetores de clonagem);
- Hibridização de ácidos nucleicos para a identificação de sequências de DNA ou RNA;
- Sequenciamento de DNA (identificação de gene e da sequência de aminoácidos das proteínas por eles codificadas);
- Síntese de DNA complementar (cDNA) com **transcriptase reversa**.

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978



Werner Arber



Daniel Nathans



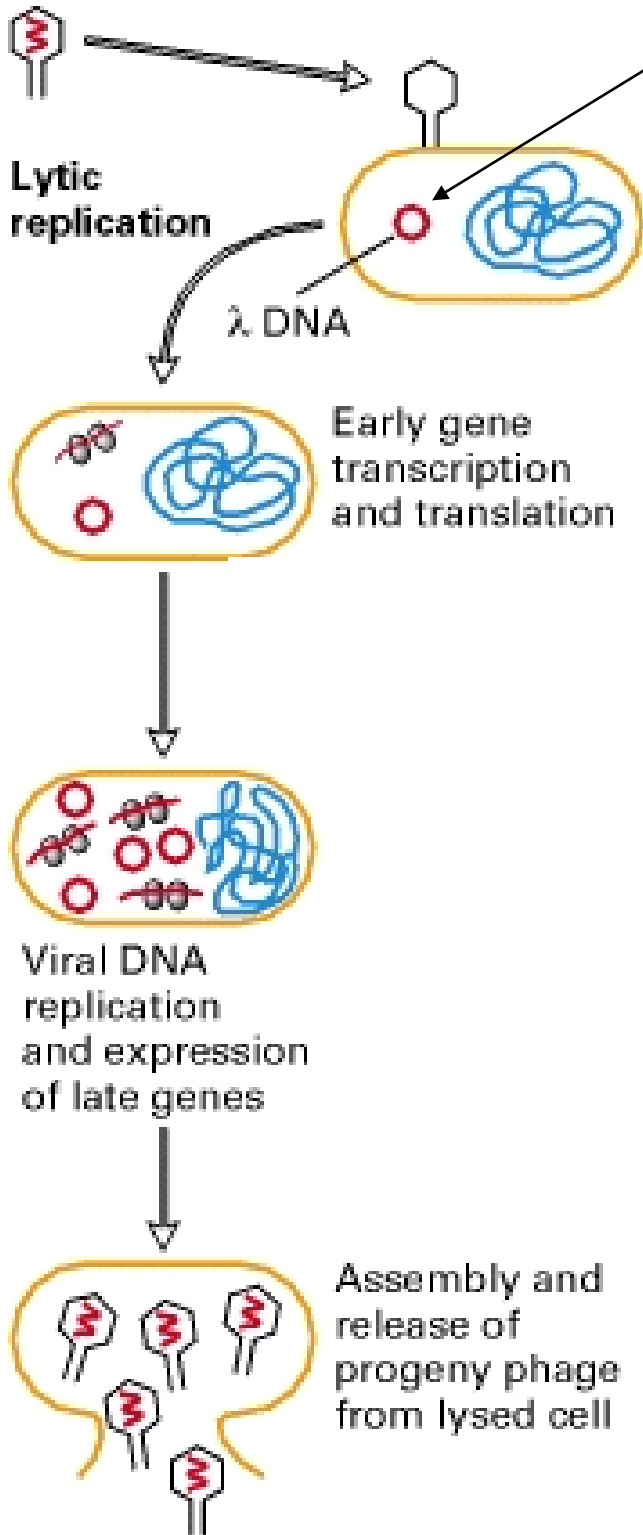
Hamilton O. Smith



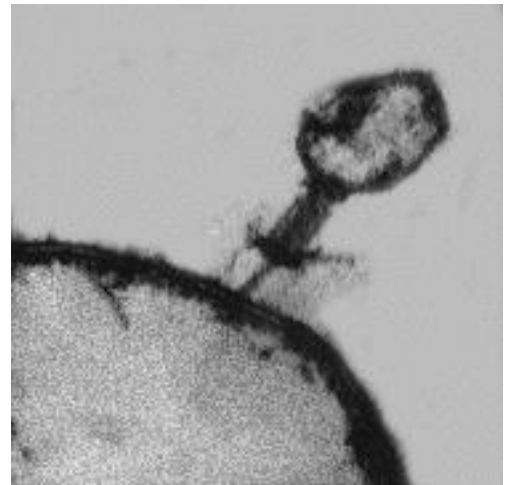
- Descobertas no final da década de 60.
- Presentes em diversos procariotos (função de clivar moléculas de DNA estranhas)
- Endonucleases que reconhecem seqs. específicas de DNA dupla fita e clivam as duas fitas.
- As sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição são palindrômicas

Ciclo lítico do bacteriófago lambda (λ)

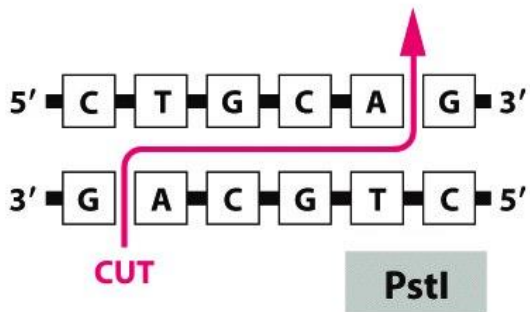
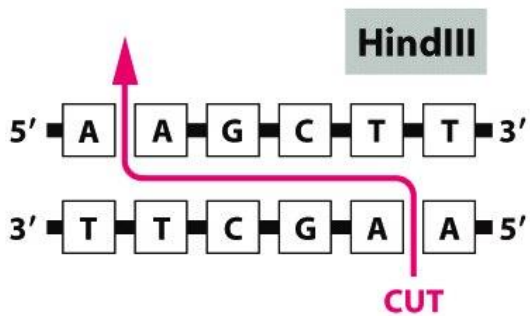
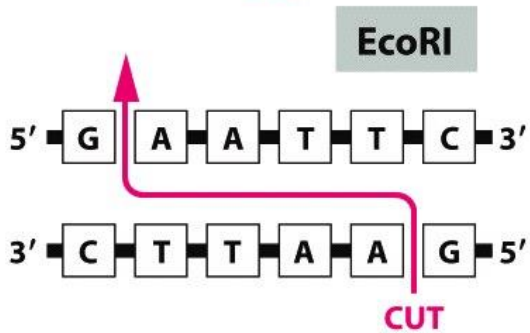
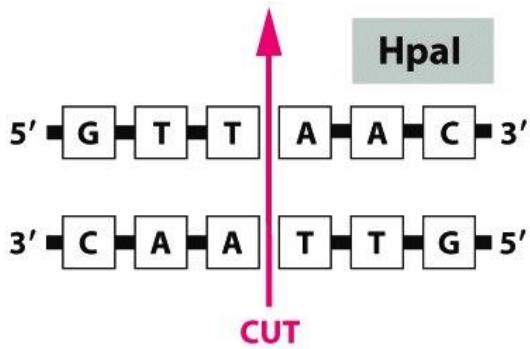
Enzimas de restrição: enzimas presentes em bactérias que restringem DNA estranho à célula



E. coli chromosome



Sítios para enzimas de restrição



Sequências
palindrômicas

4-8 pbs

Figure 8-31 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

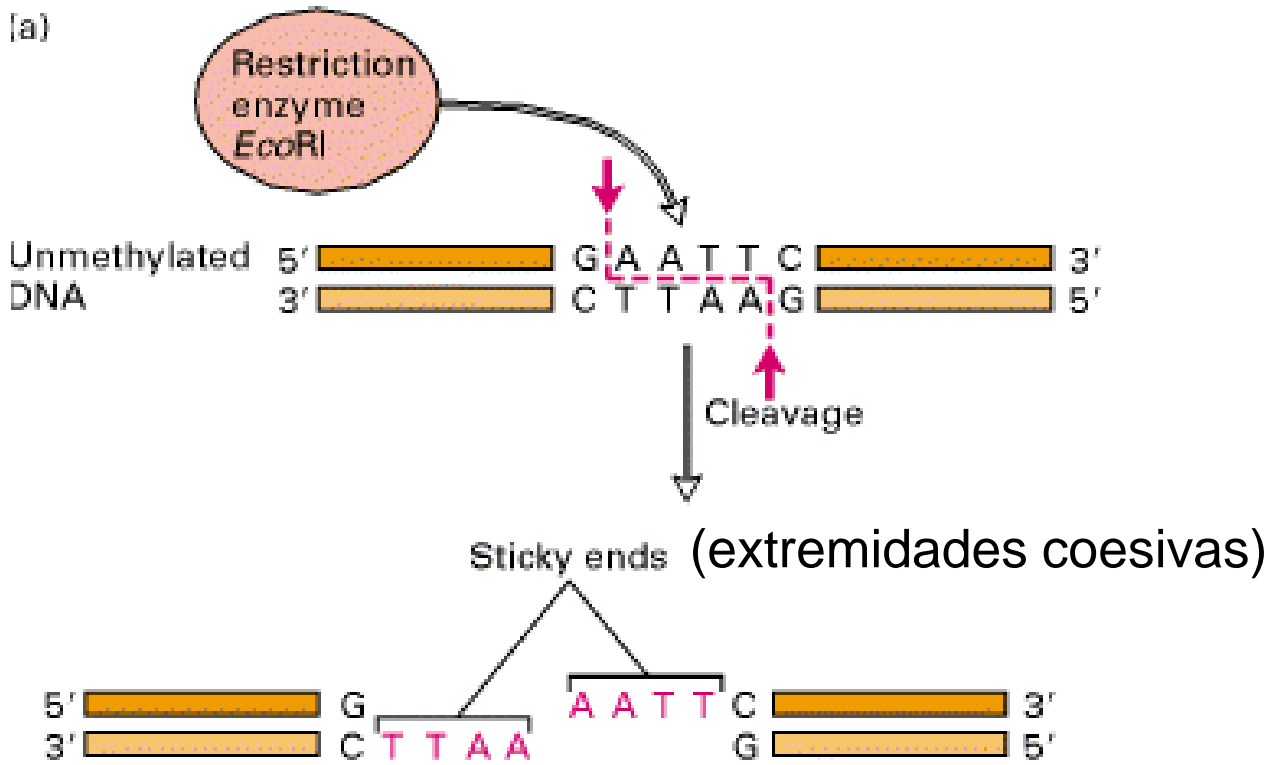
HpaI *Hemophilus parainfluenzae*

EcoRI *Escherichia coli*

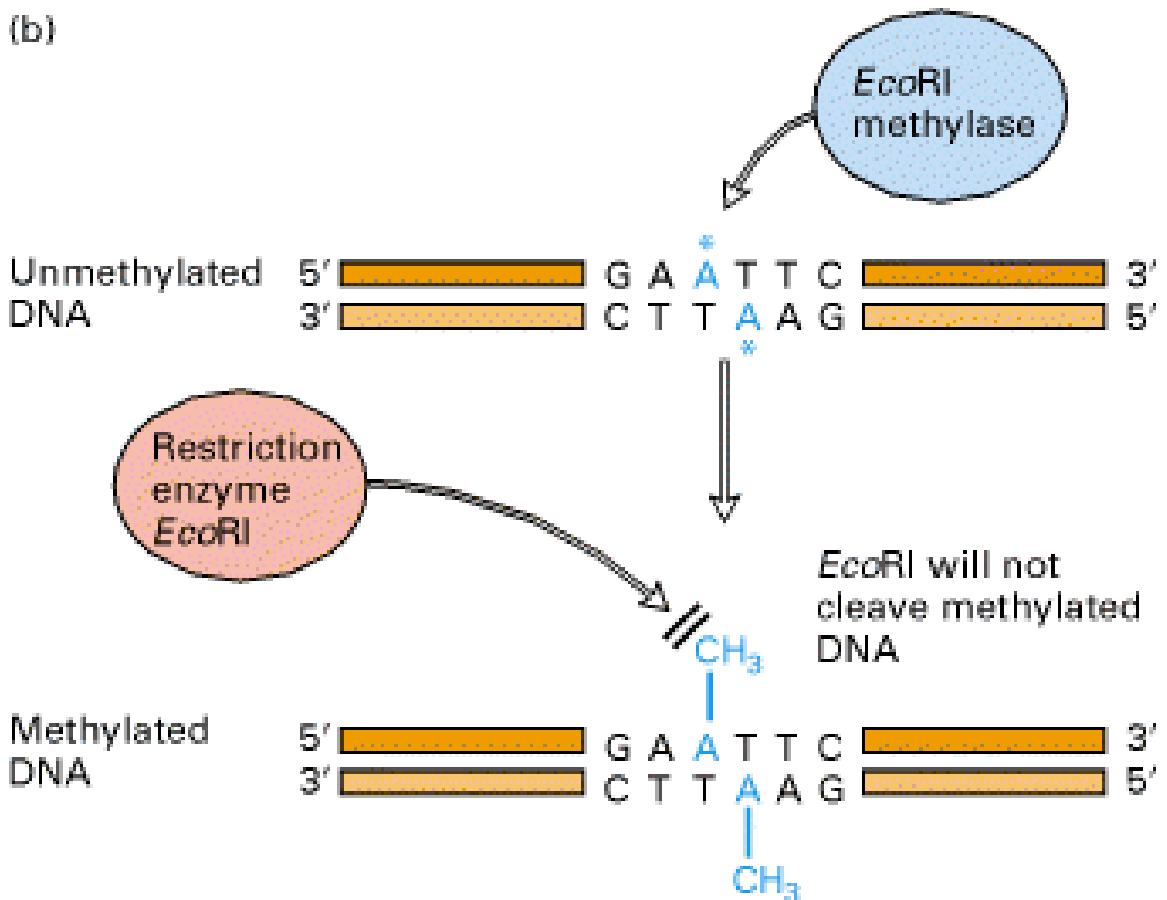
HindIII *Hemophilus influenzae*

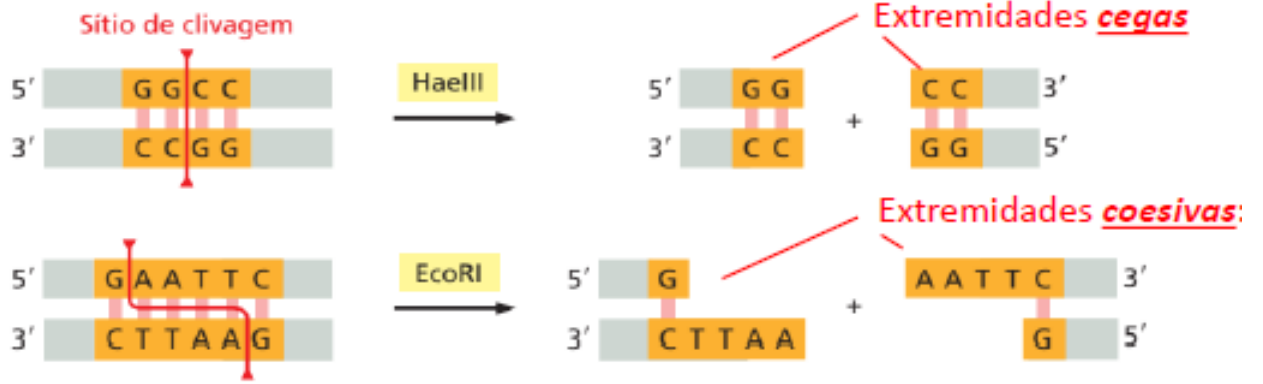
PstI *Providencia stuartii*.

(a)



(b)





Clonagem de DNA

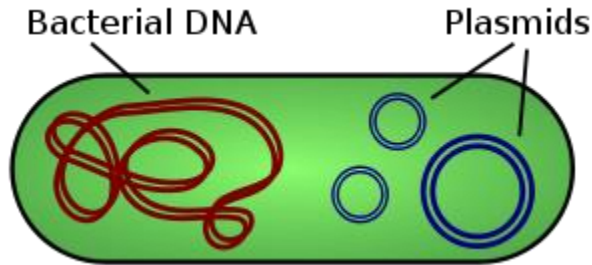
Isolamento e propagação de moléculas idênticas de DNA.

Envolve:

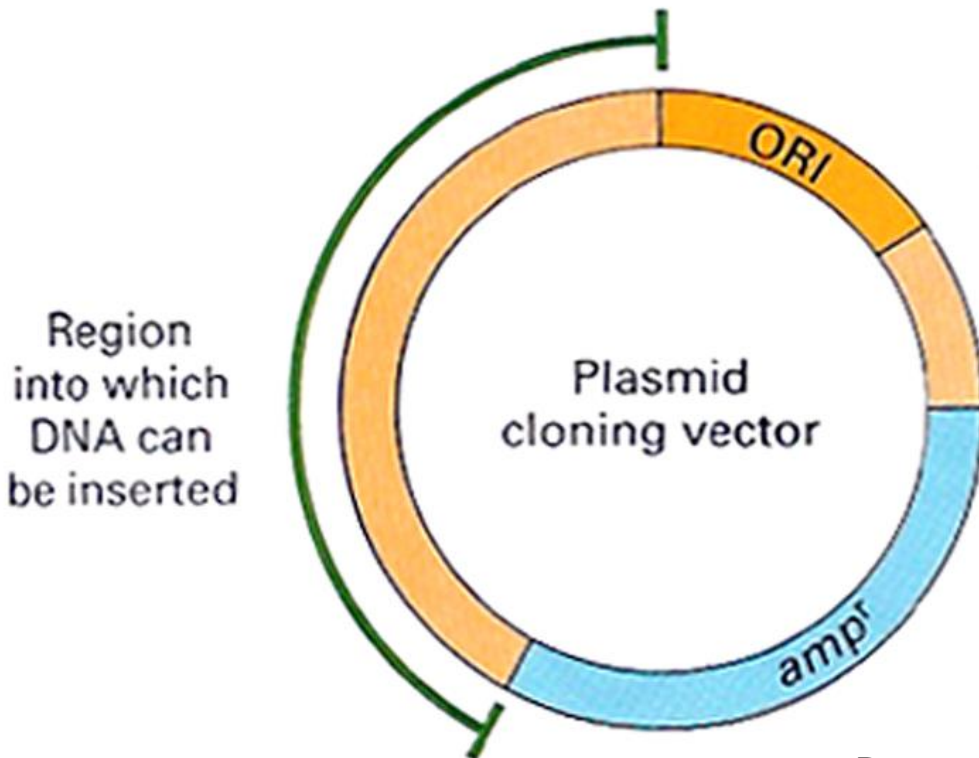
- 1- Construção de molécula de DNA recombinante (formada pela ligação de um inserto de DNA a um vetor de clonagem).
- 2- Introdução da molécula recombinante em uma célula hospedeira (transformação bacteriana).

Plasmídeos

Originalmente encontrados em bactérias, leveduras

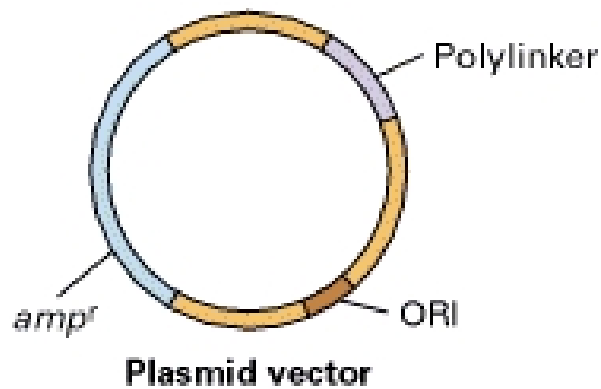
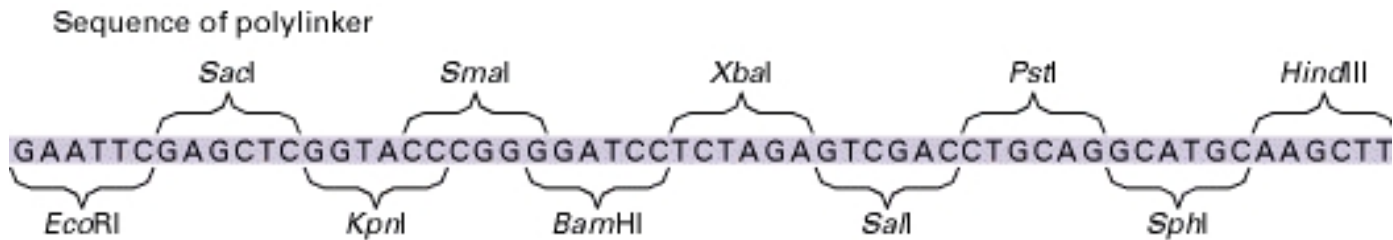


Plasmídeos como vetor de clonagem



Gene amp^R codifica para a enzima β -lactamase, que degrada o antibiótico ampicilina (marcador de seleção)

Sítio múltiplo de clonagem (*polylinker*) em vetores plasmidiais



Inserção de um DNA em um plasmídeo

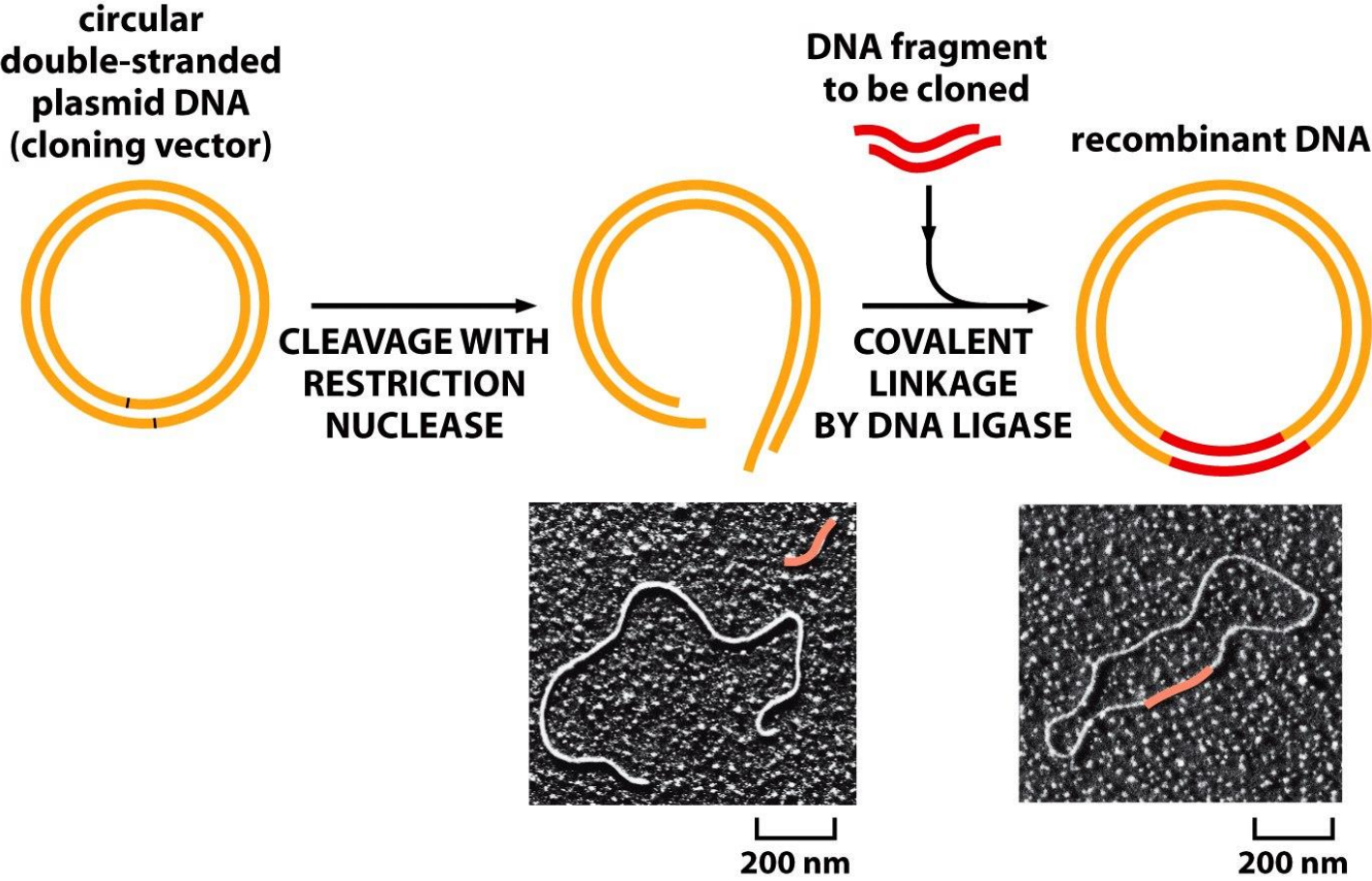
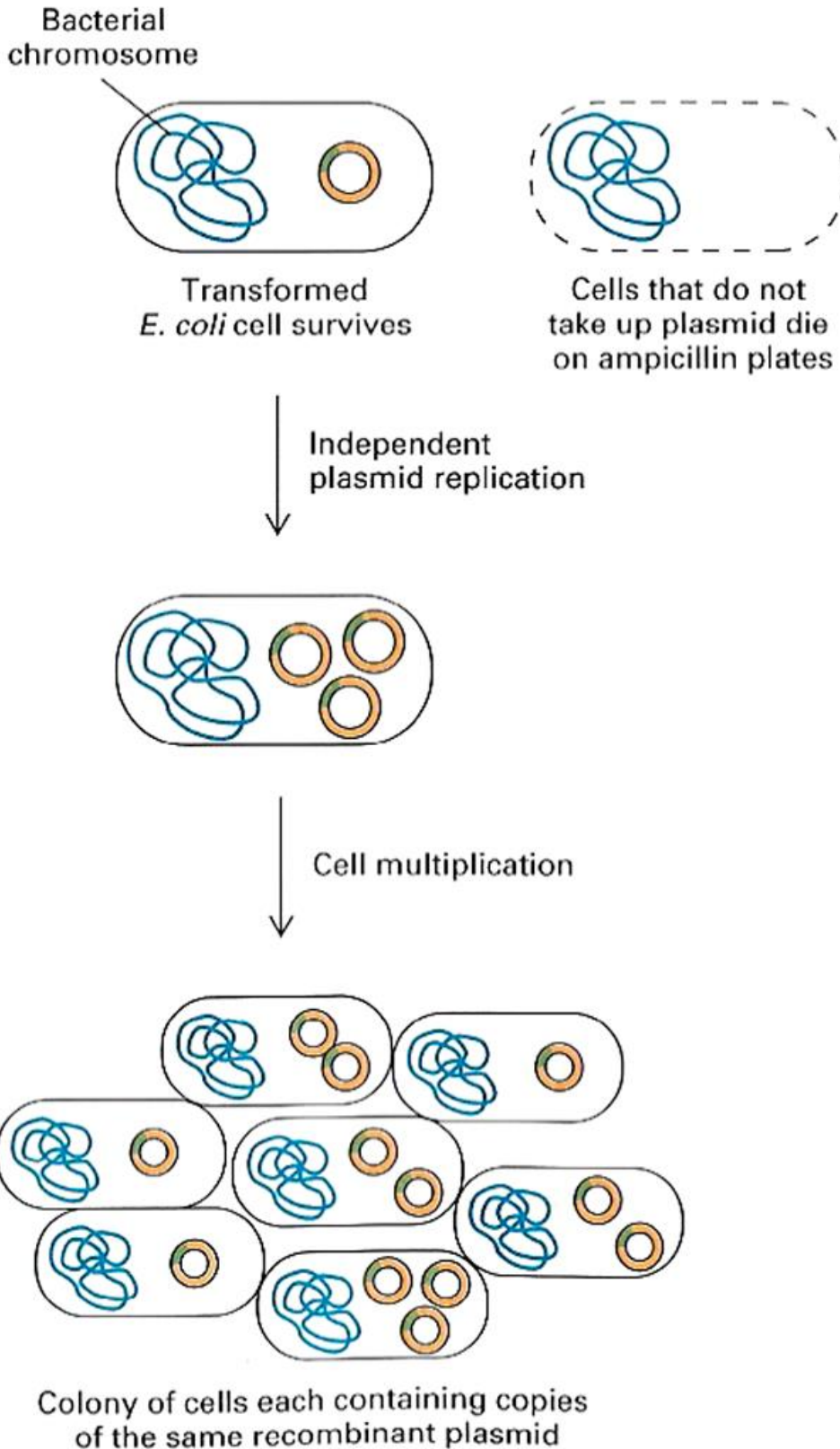


Figure 8-39 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Transformação bacteriana





Plasmid vectors

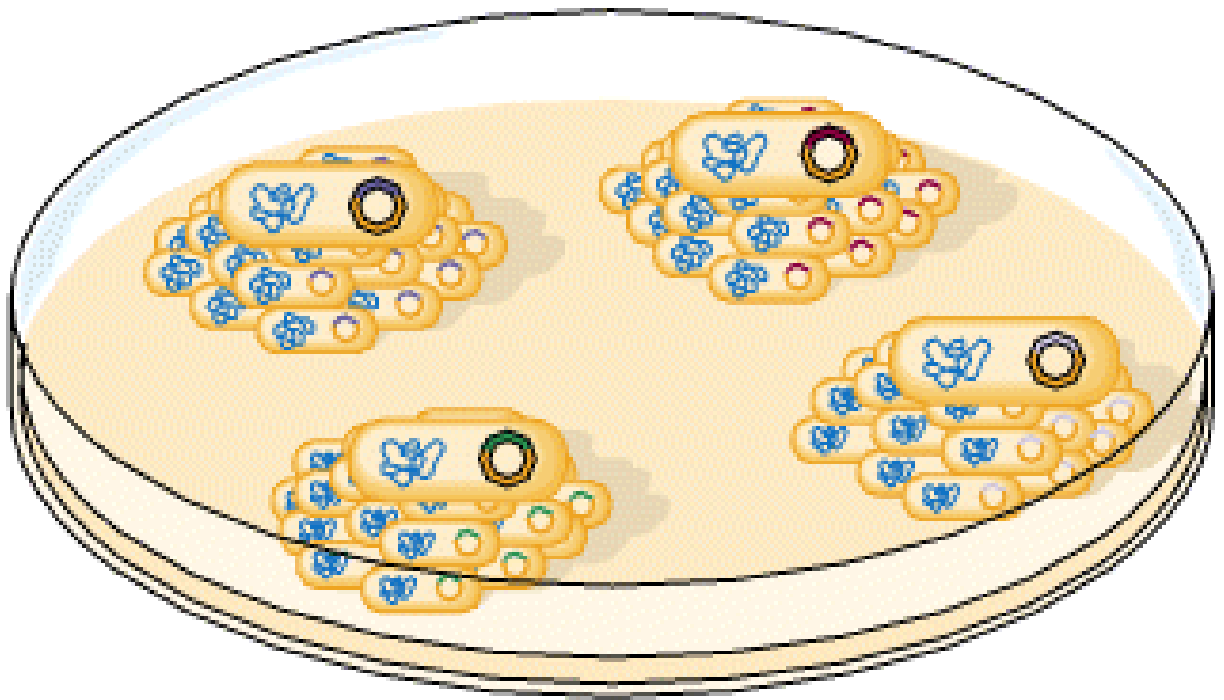


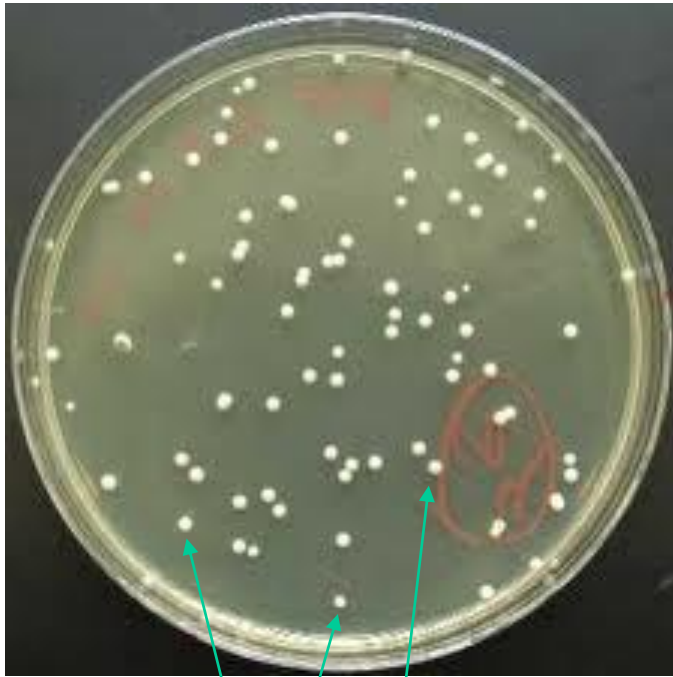
DNA fragments to be cloned

Enzymatically
insert DNA fragments
into plasmid vectors



Transform *E. coli* cells
and select for ampicillin-
resistant colonies





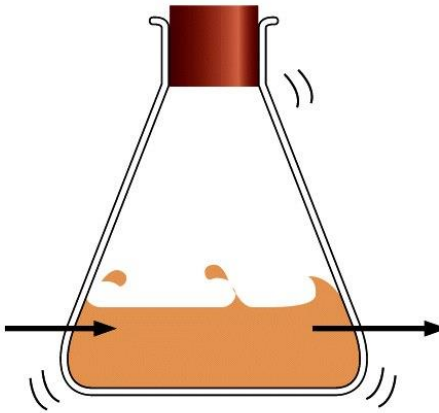
Colônias de *E.coli*

Amplificação do DNA clonado

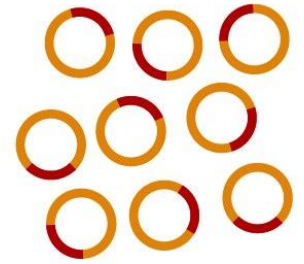
**double-stranded
recombinant
plasmid DNA
introduced into
bacterial cell**



**bacterial
cell**

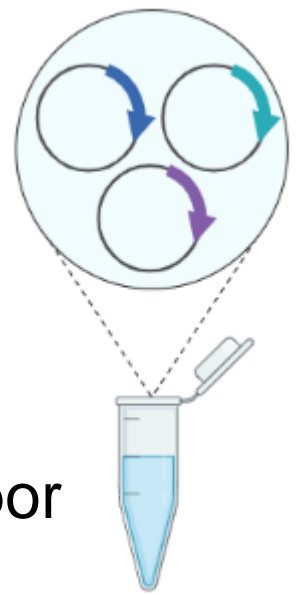


**cell culture produces
hundreds of millions of
new bacteria**



**many copies of purified
recombinant plasmid
isolated from lysed
bacterial cells**

Bibliotecas de DNA



Fragmentos de DNA são estocados por ex. em bactérias, em vetores de clonagem, cada um contendo um fragmento de DNA diferente.

Tipos de bibliotecas de DNA:

Biblioteca genômica: coleção de clones que inclui todas as sequências de DNA genômico de uma espécie.

Biblioteca de cDNA (DNA complementar): coleção de clones de cDNA, que correspondem a todos os RNAs mensageiros de um dado tecido ou tipo celular.

Biblioteca genômica

Construção de uma biblioteca genômica

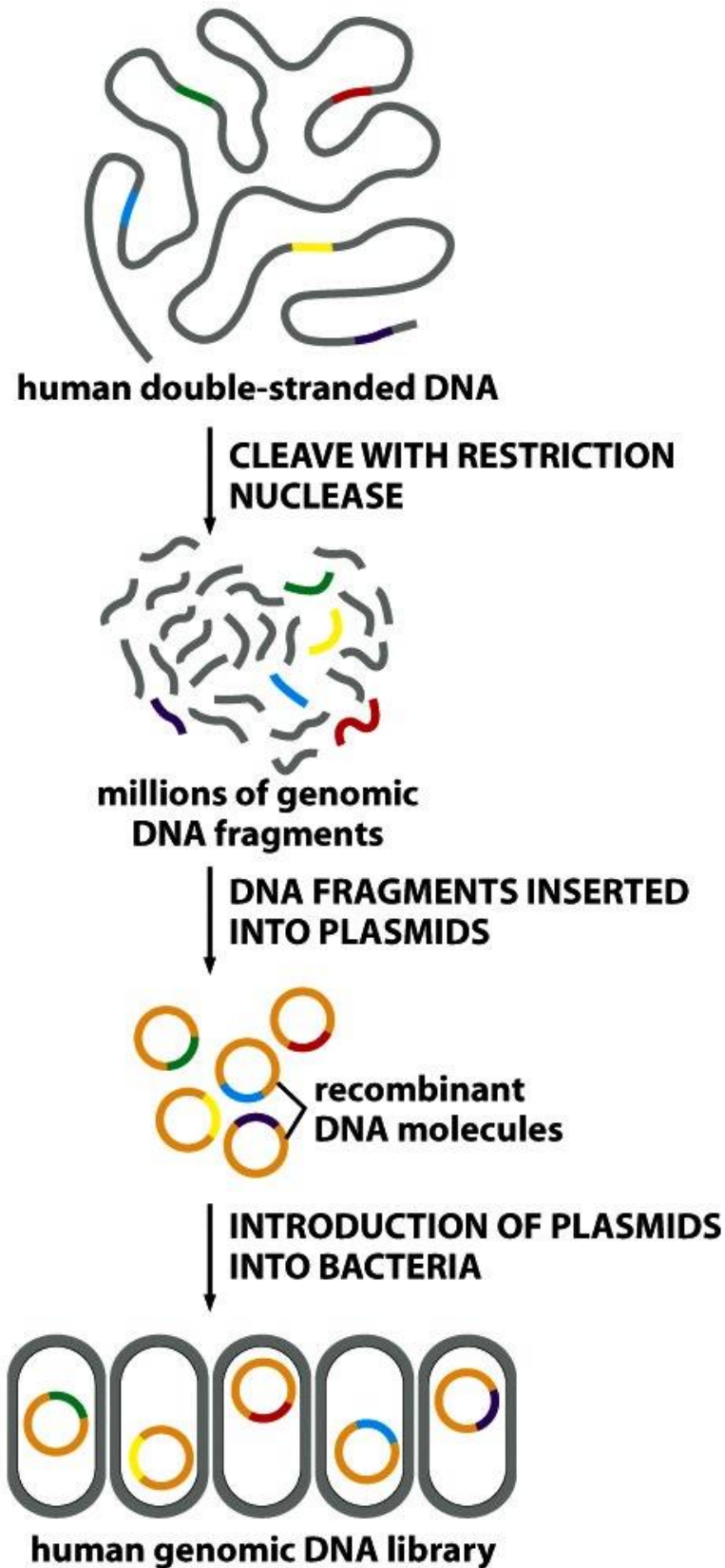


Figure 8-42 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

DNA complementar (cDNA):

DNA sintetizado pela transcriptase reversa usando como molde RNA mensageiro

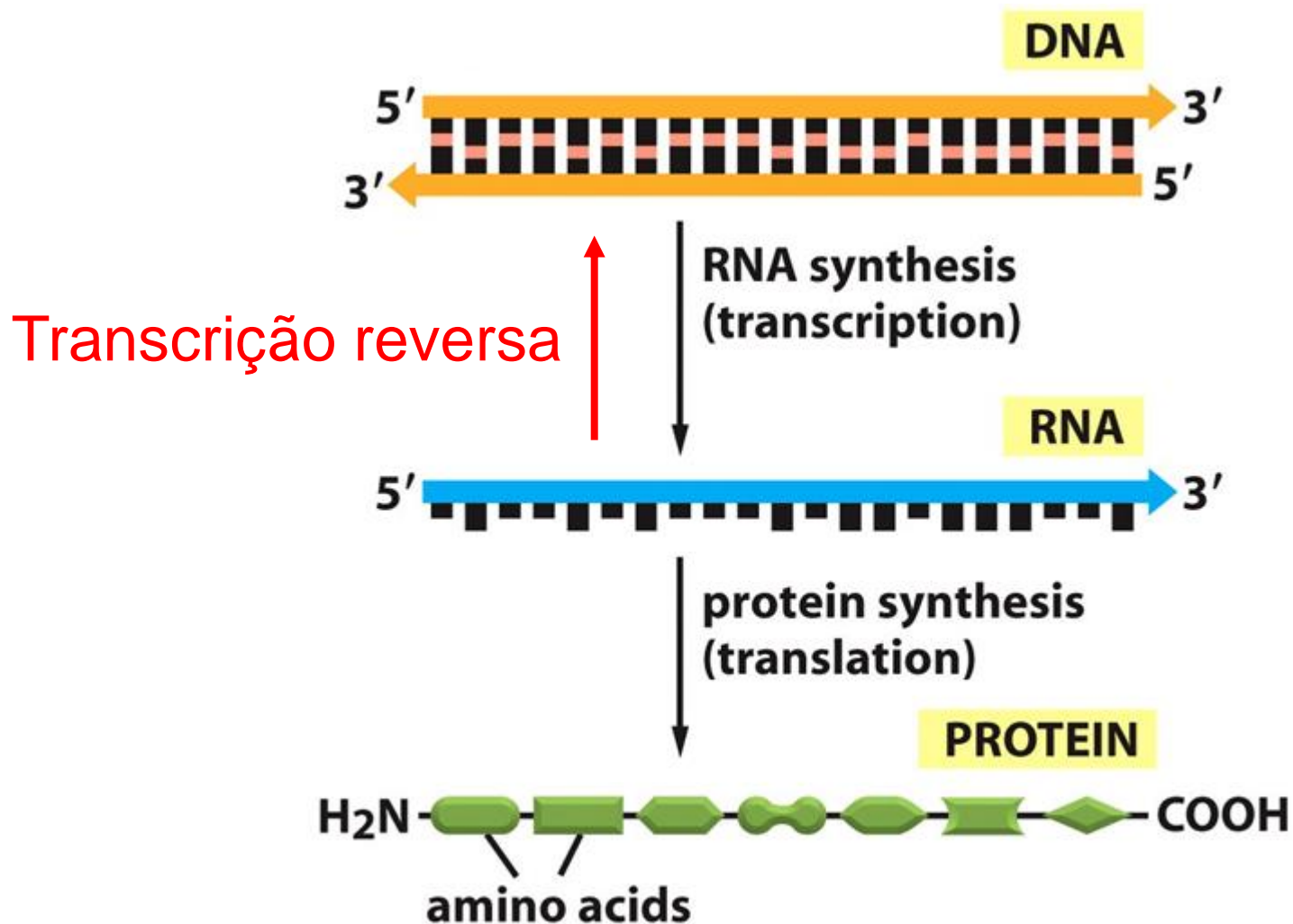
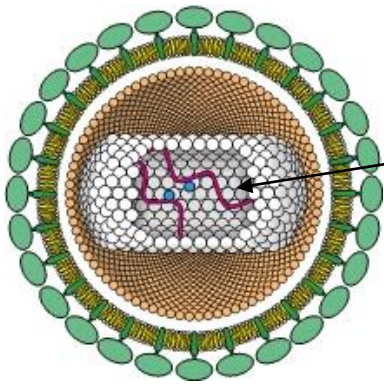


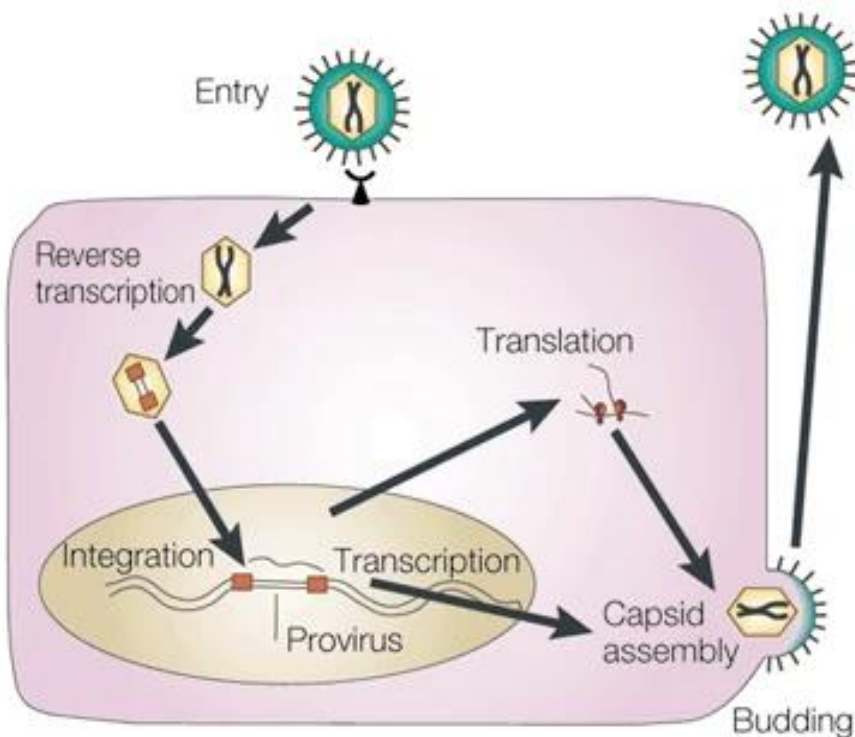
Figure 6-2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Transcriptase Reversa

Retrovirus: vírus de RNA simples fita que se replica na célula hospedeira através do processo de transcrição reversa.



Transcriptase Reversa
(RNA-directed DNA polimerase)



Bibliotecas de DNA complementar (cDNA)

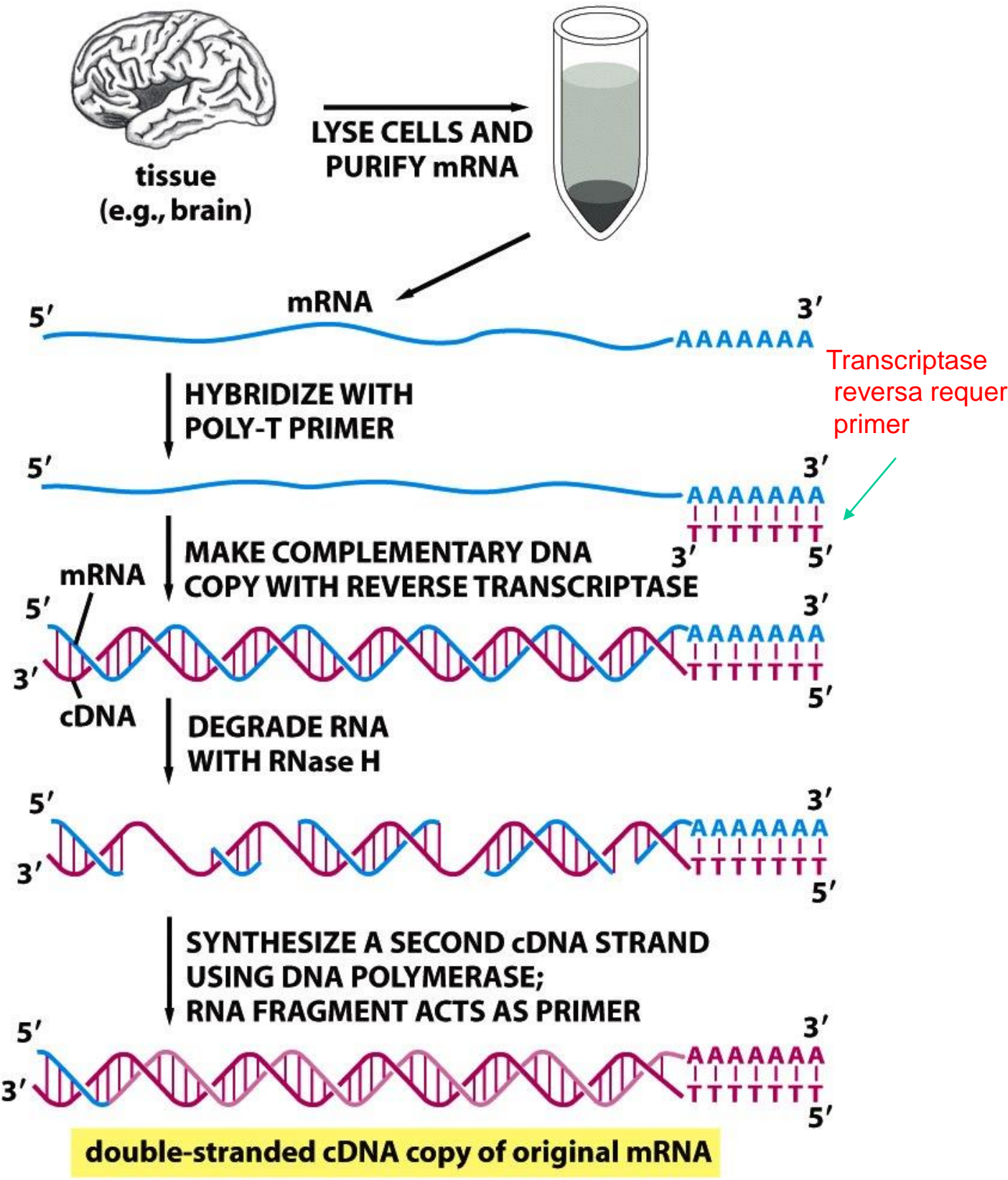


Figure 8-43 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Diferenças entre clones de cDNA e de DNA genômico derivadas de uma mesma região do DNA

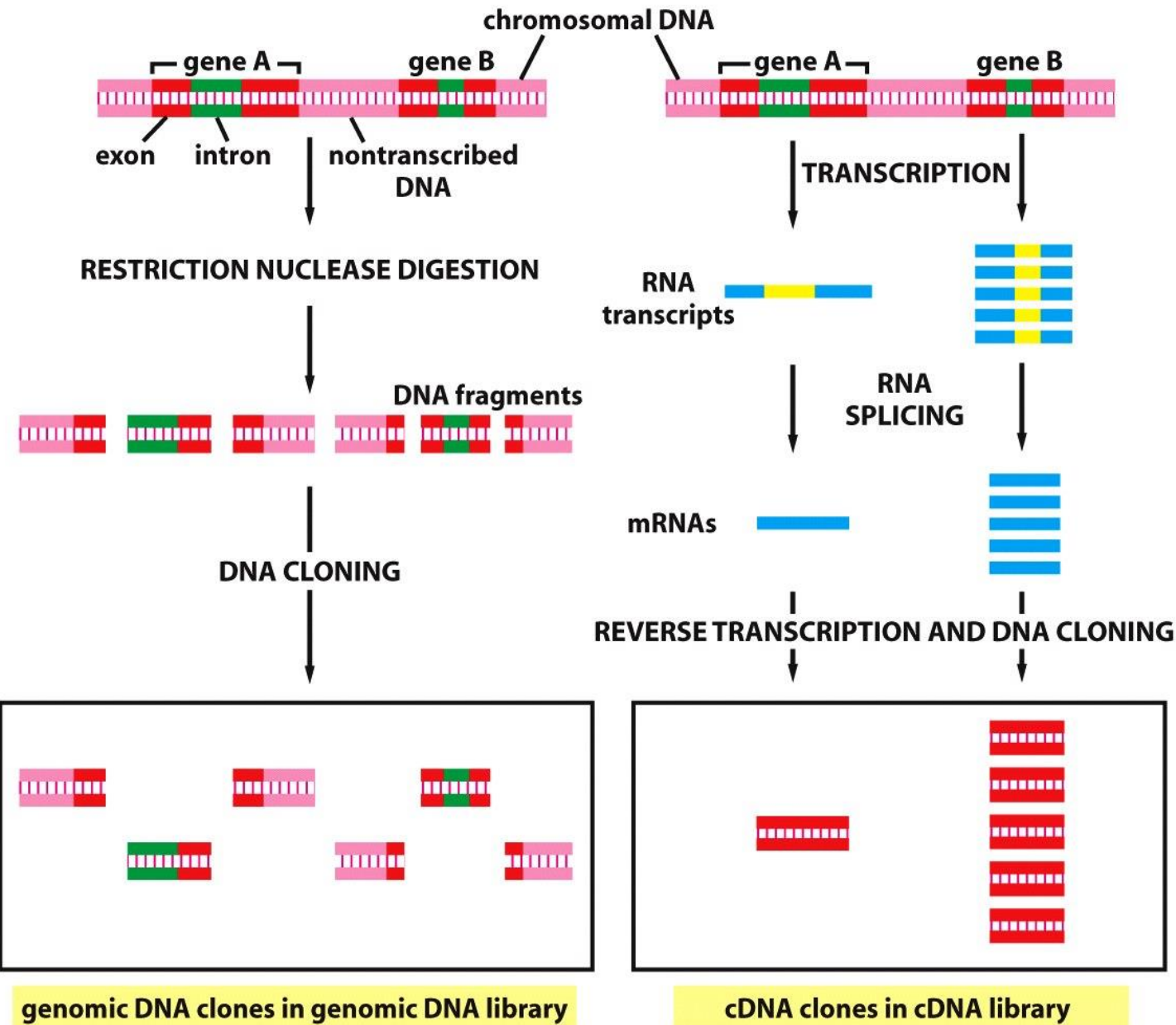
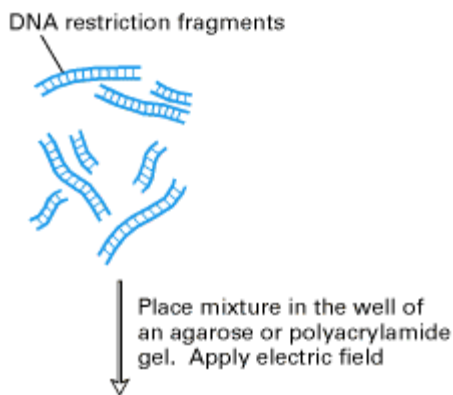


Figure 8-44 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

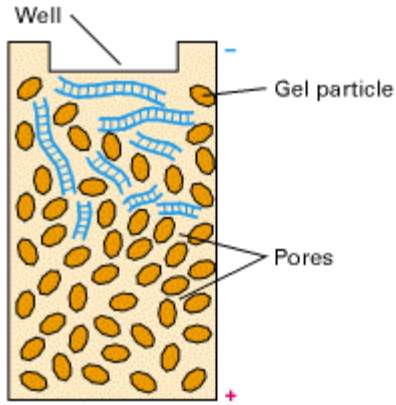
Biblioteca Genômica	Biblioteca cDNA
Regiões <u>codificantes</u> e <u>não-codificantes</u>	Só regiões <u>codificantes</u>
<u>Igual</u> para todos tecidos	<u>Diferente</u> em cada tecido
Igual em todos estágios	"Fotografia" momentânea
Determinação do <u>genoma</u>	Determinação do <u>transcriptoma</u>

Técnicas de análise de DNA

Eletroforese em gel de agarose

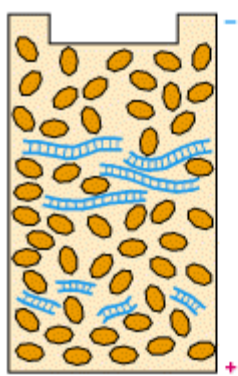


O DNA (carga negativa) migra para o eletrodo positivo.



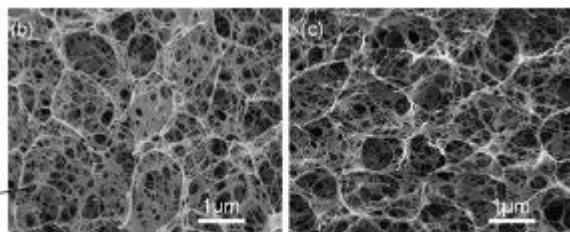
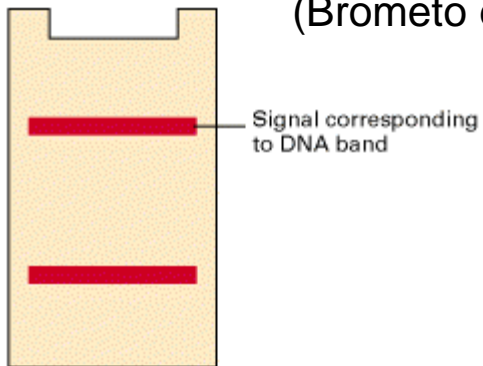
Molecules move through pores in gel at a rate inversely proportional to their chain length

Moléculas maiores migram mais devagar que as menores, pois encontram mais resistência para passar pelos poros do gel.



Subject to autoradiography or incubate with fluorescent dye

(Brometo de etídeo)



Mao et al., 2016. Normal force controlled rheology applied to agar gelation. Journal of Rheology 60(3):473-489.

Brometo de etídeo

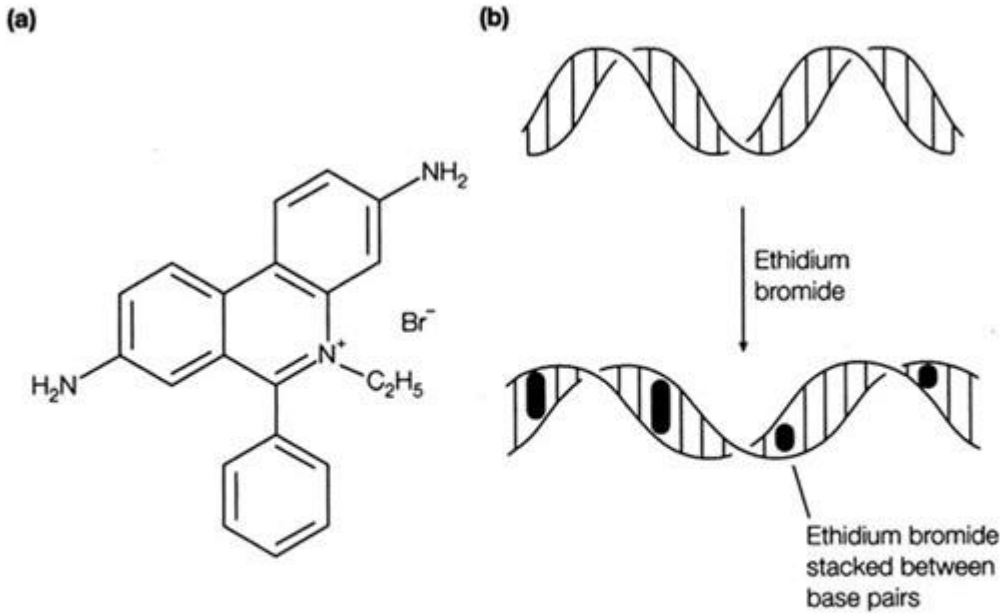
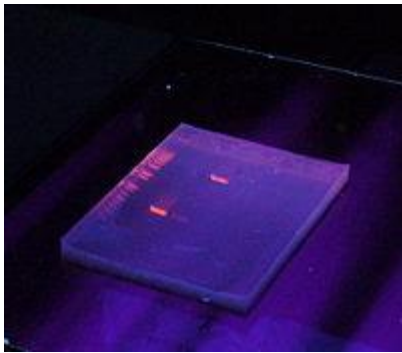


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



Gel corado com brometo de etídeo e exposto a luz UV

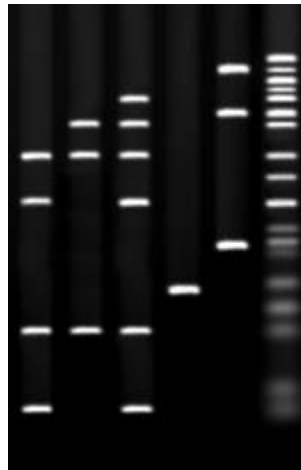
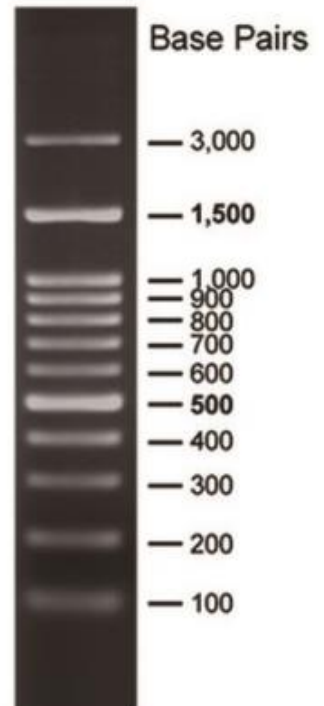
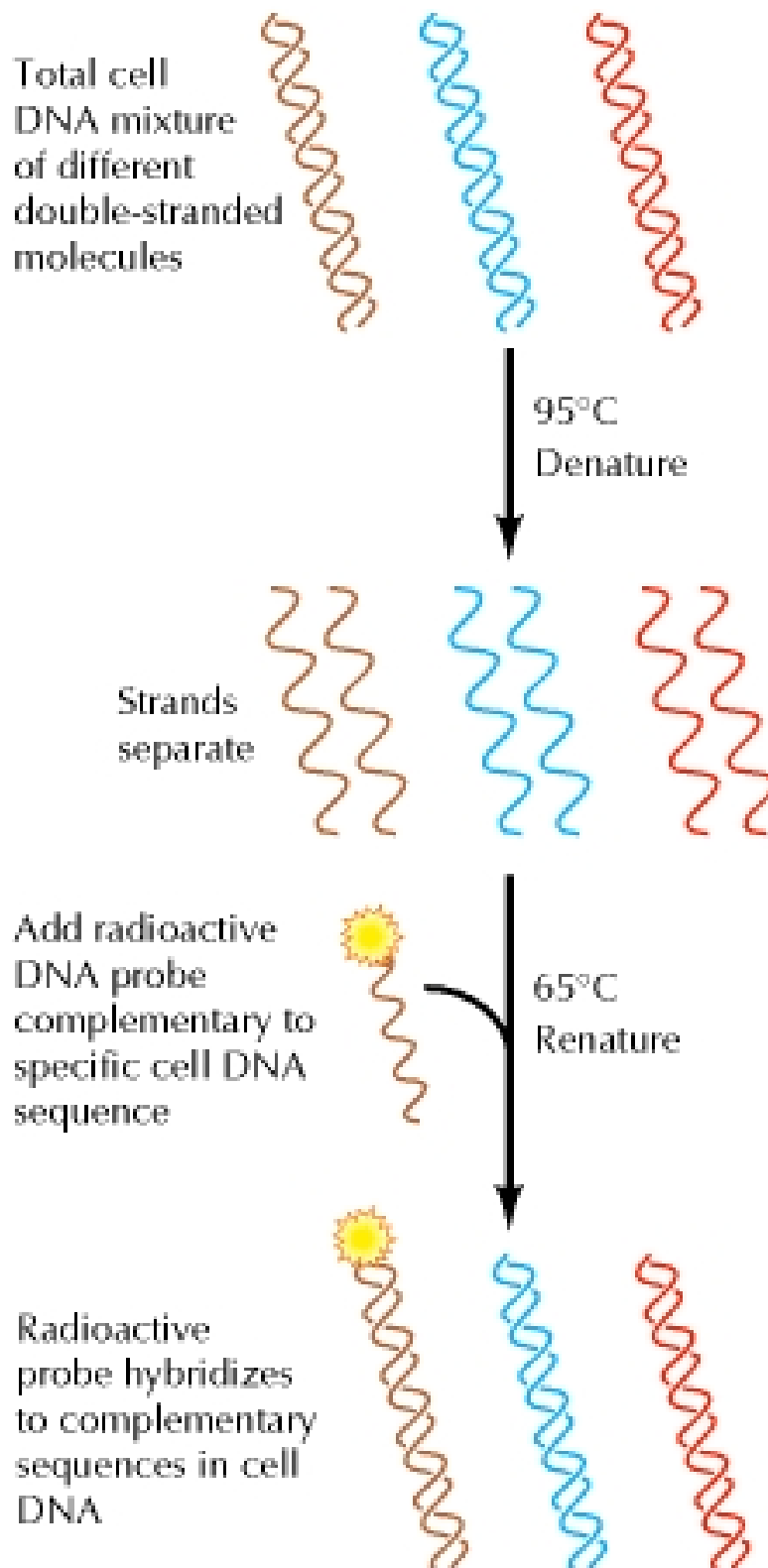


Foto de gel

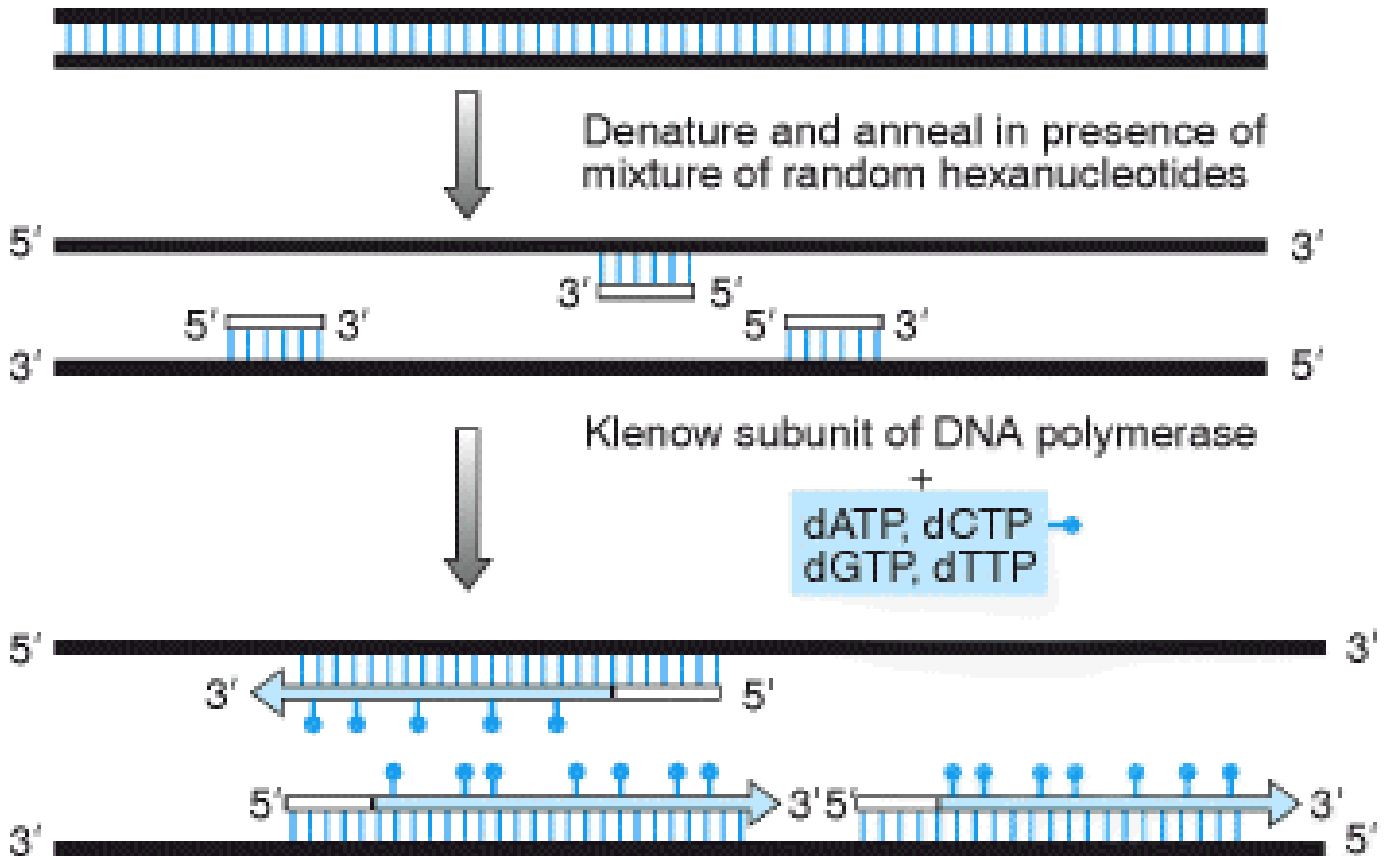
Padrão de peso molecular



Detecção de DNA através de hibridização



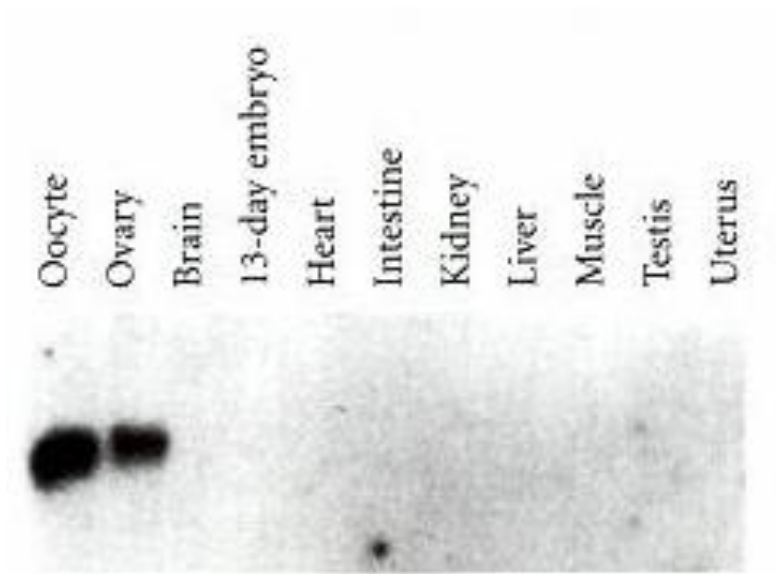
Preparação de sondas radioativas



Key:
♣ Labeled nucleotide

Sondas = fragmento de DNA usado para procurar moléculas complementares em misturas complexas ou cromossomos (DNA ou RNA)

Northern blot



Sonda utilizada:
Fragmento de DNA
correspondente ao
gene ZP3

Padrão de expressão do gene ZP3

Técnica	Alvo
Southern Blotting (Edward Southern)	DNA
Northern Blotting	RNA
Western Blotting	Proteína

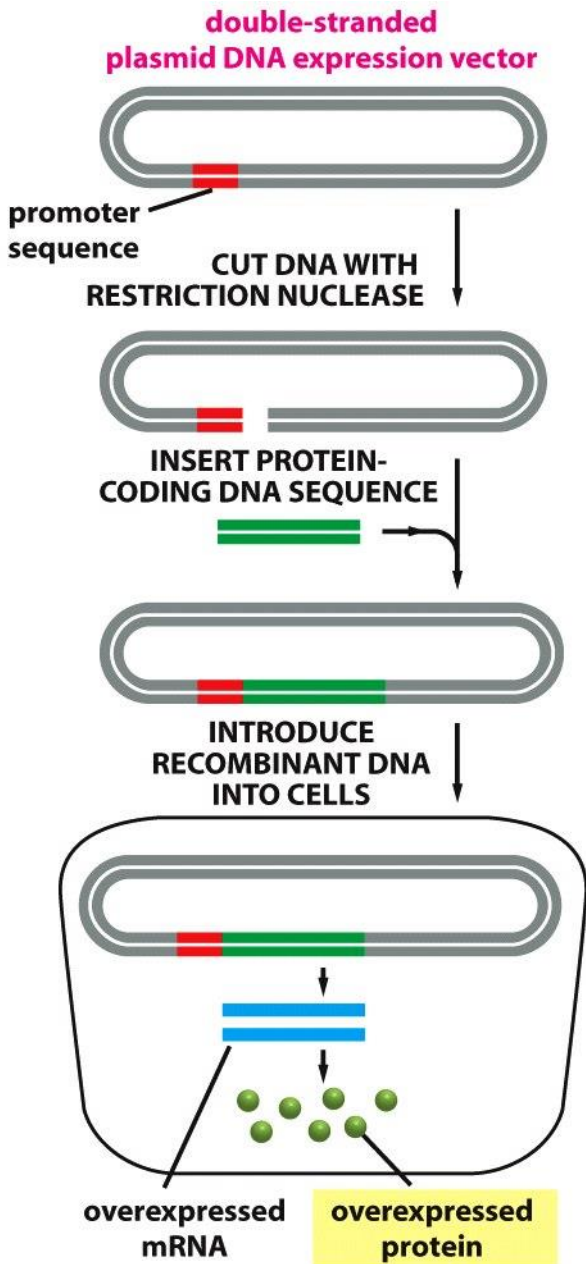
A amostra é transferida do gel para uma membrana (blotting).

A sonda fica em concentração muito mais alta que o alvo.

As condições são desnaturantes (pH, força iônica [sal], temperatura). São modificadas para permitir renaturação.

Expressão heteróloga de proteínas

Células podem ser utilizadas como fábricas para a produção de proteínas.



Vetor de expressão

Proteínas recombinantes



Ex: insulina