

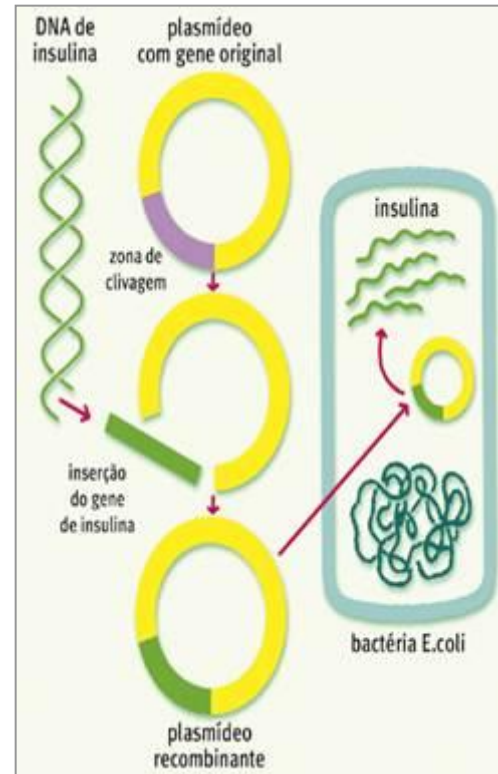
Tecnologia do DNA recombinante

Watson & Crick Estrutura do química do DNA (1953)



Nature, 25 - Abr - 1953

Tecnologia DNA recombinante Insulina recombinante (1978)

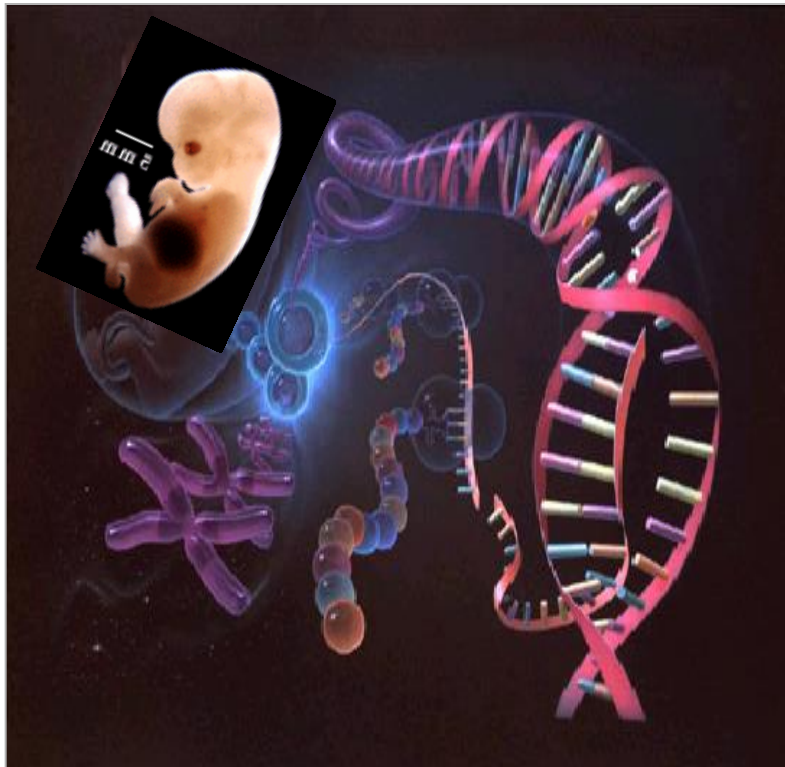


Ian Wilmut clonagem de mamífero (1997)

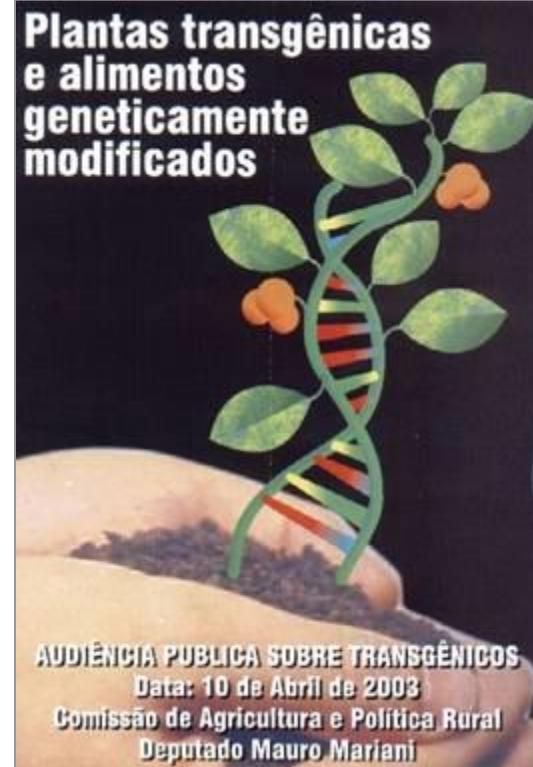


PGH

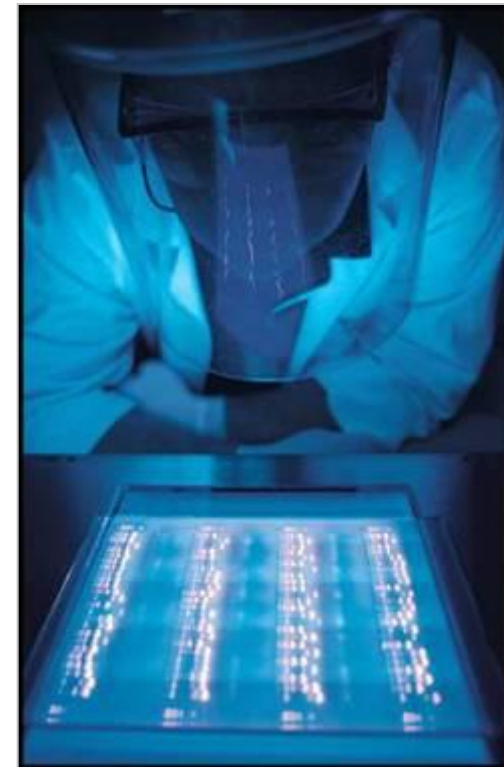
*Conhecer genoma *H. sapiens*
(1995-2003)*



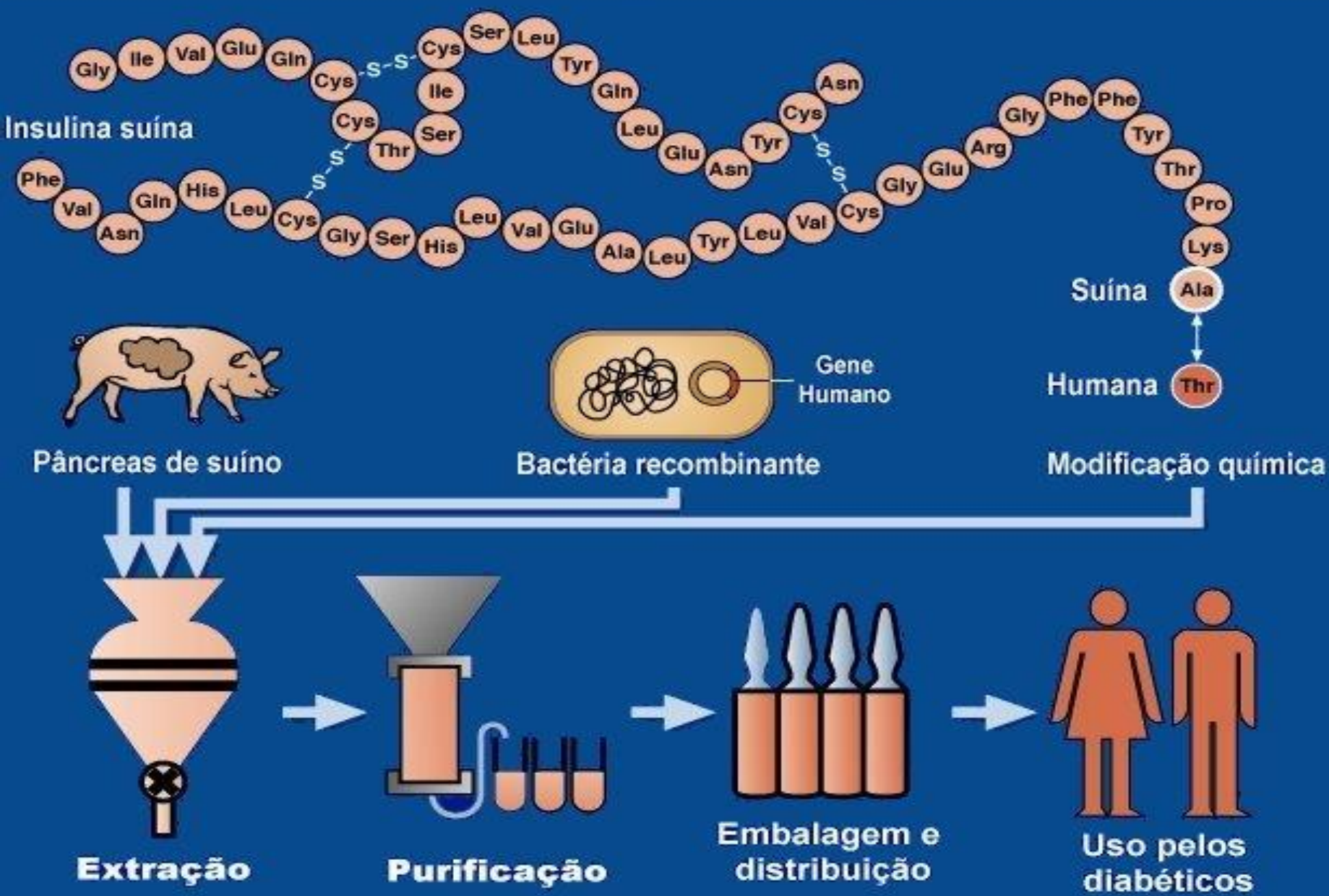
Transgenia (1995-2006)



Prática clínica Testes genéticos (1995-2006)



Milhões de Diabéticos necessitam de Insulina para sobreviver



“A engenharia genética atua no nível molecular, onde as diferenças entre espécies desaparecem”



O que é um DNA recombinante?

- É uma molécula de DNA formada pela ligação de duas moléculas de origens diferentes (Ex. DNA de planta ligado a um plasmídeo)

ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Descritas em 1970,

W. Alber



H. Smith

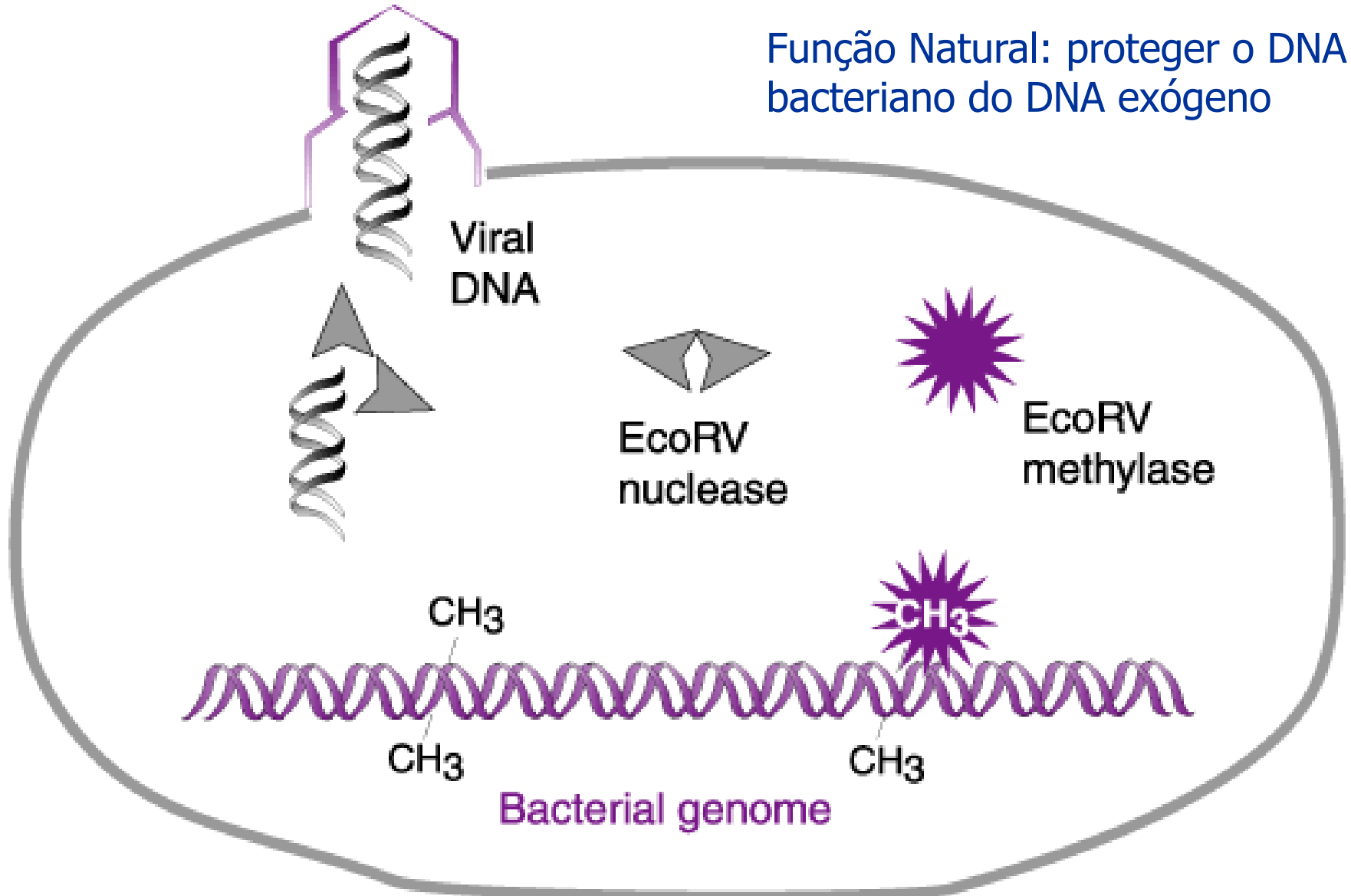


D. Nathans

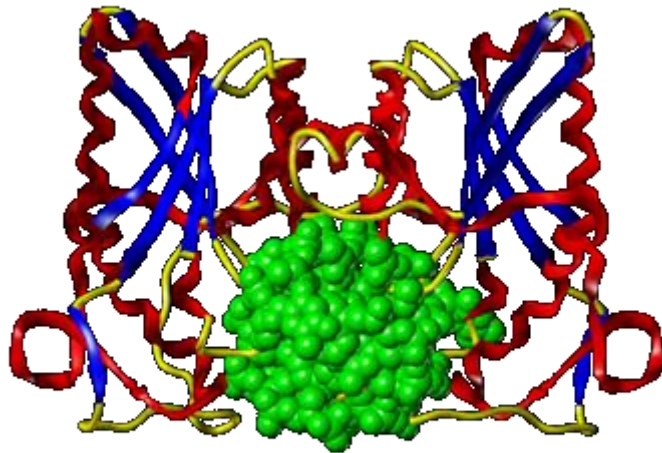


- Uma enzima de restrição ou endonuclease de restrição é um tipo de nuclease que cliva a dupla fita de DNA sempre que identificar uma seqüência particular de nucleotídios que seja o sítio de reconhecimento da enzima;

Função Natural: proteger o DNA bacteriano do DNA exógeno

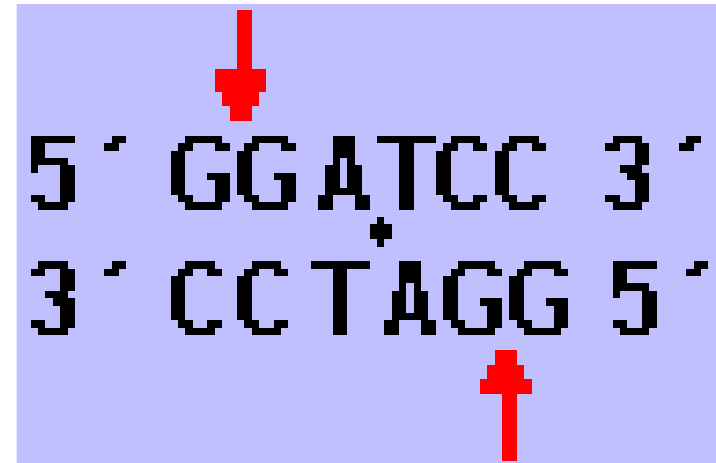


A enzima ***Bam*HI** reconhece a seqüência dupla fita:



ENDONUCLEASE BAMHI (1BHM)

*Bam*HI



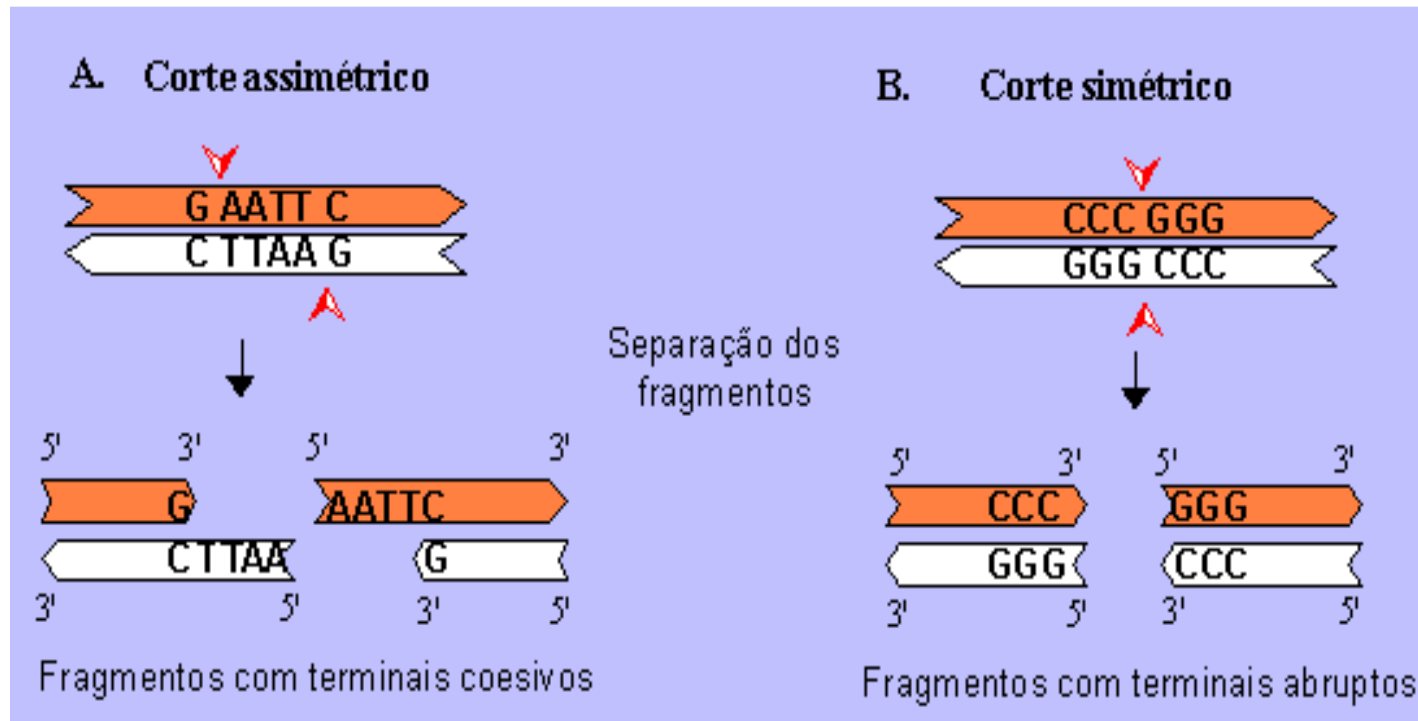
- reconhecem seqüências específicas de nucleotídeos no **DNA** - palíndromes, atuando como verdadeiras tesouras moleculares

Nomenclatura

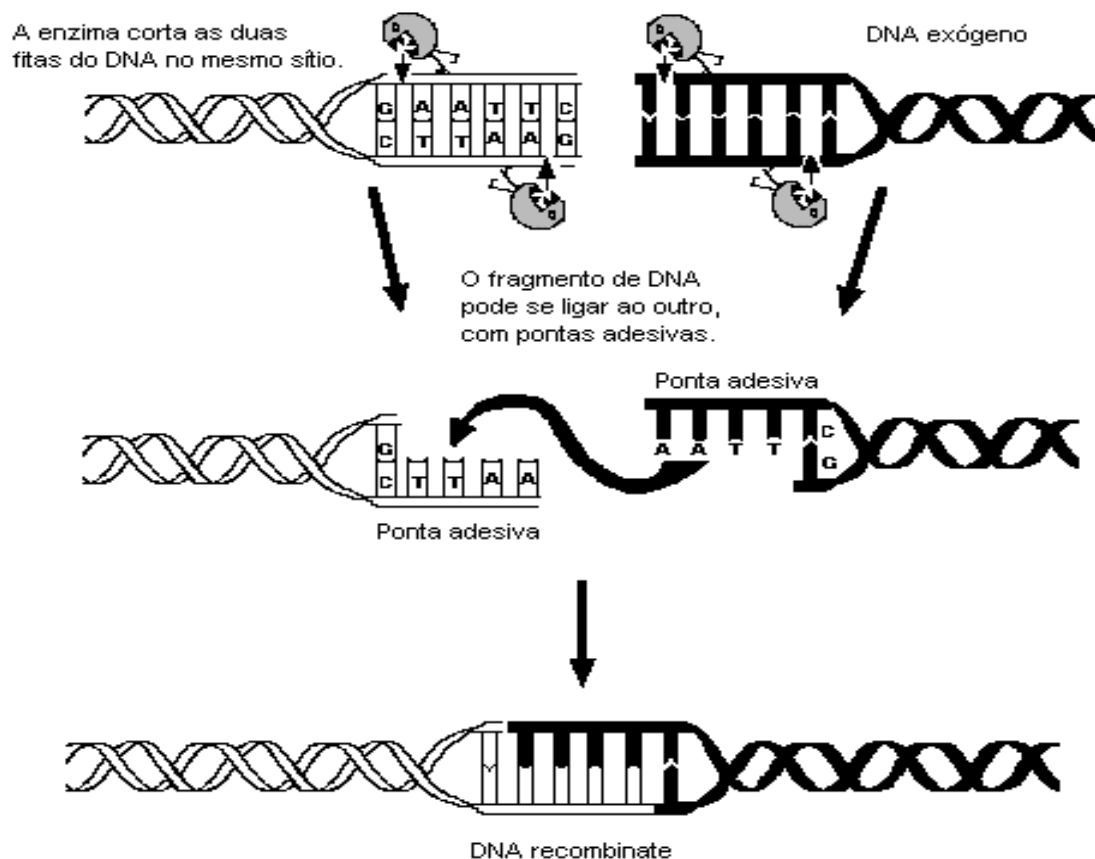
- *Bam*HI - *Bacillus amyloliquefaciens* H
5' G/GATCC 3'
- *Eco*RI - *Escherichia coli* R
5' G/AATTC 3'
- *Hae*III - *Haemophilus aegyptius*
5' GG/CC 3'
- *Pst*I - *Providencia stuartii*
5' CTGCA/G 3'

Tipos de cortes:

- Produção de terminais coesivos (adesivos, protuberantes)
- Produção de terminais abruptos (ou cegos)



Enzima de Restrição Ação da EcoR1



37^o C, 1 hora,
com tampão
adequado

						NarI ~~~~~
181	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	CCGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCC
	TGGTATACGC	CACACTTTAT	GGCGTGTCTA	CGCATTCTC	TTTTATGGCG	TAGTCCGCGG
241	ATTCGCCATT	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT
	TAAGCGGTAA	GTCCGACGCG	TTGACAACCC	TTCCCGCTAG	CCACGCCCGG	AGAAGCGATA
301	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	ACGCCAGGGT
	ATGCGGTCGA	CCGCTTTCCC	CCTACACGAC	GTTCCGCTAA	TTCAACCCAT	TGCGGTCCCA
					HindIII ~~~~~	PstI ~~~~~
361	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGCCAA	GCTTGCATGC	CTGCAGGTCG
	AAAGGGTCAG	TGCTGCAACA	TTTTGCTGCC	GGTCACGGTT	CGAACGTACG	<u>GACGT</u> CCAGC
	XbaI	BamHI	KpnI	EcoRI		
	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~		
421	ACTCTAGAGG	ATCCCCGGGT	ACCGAGCTCG	AATTCGTAAT	CATGGTCATA	GCTGTTTCCT
	TGAGATCTCC	TAGGGGCCCA	TGGCTCGAGC	<u>TTAAGC</u> ATTA	GTACCAGTAT	CGACAAAGGA

# Clonagem molecular

- É o isolamento e a propagação em um organismo de moléculas idênticas de DNA

# TIPOS DE VETORES



## Vetores

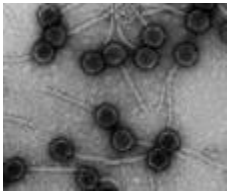
## Hospedeiros

## Utilização



**Plasmídeos**

**Cosmídeos**

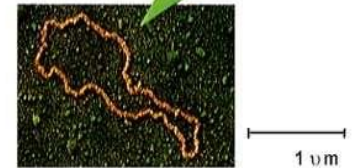
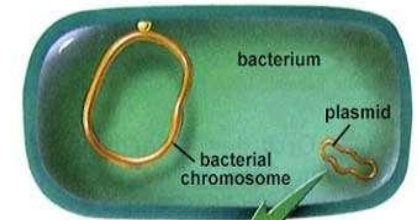


**Bacteriófagos**

**Bactérias / leveduras**



**clonagem**



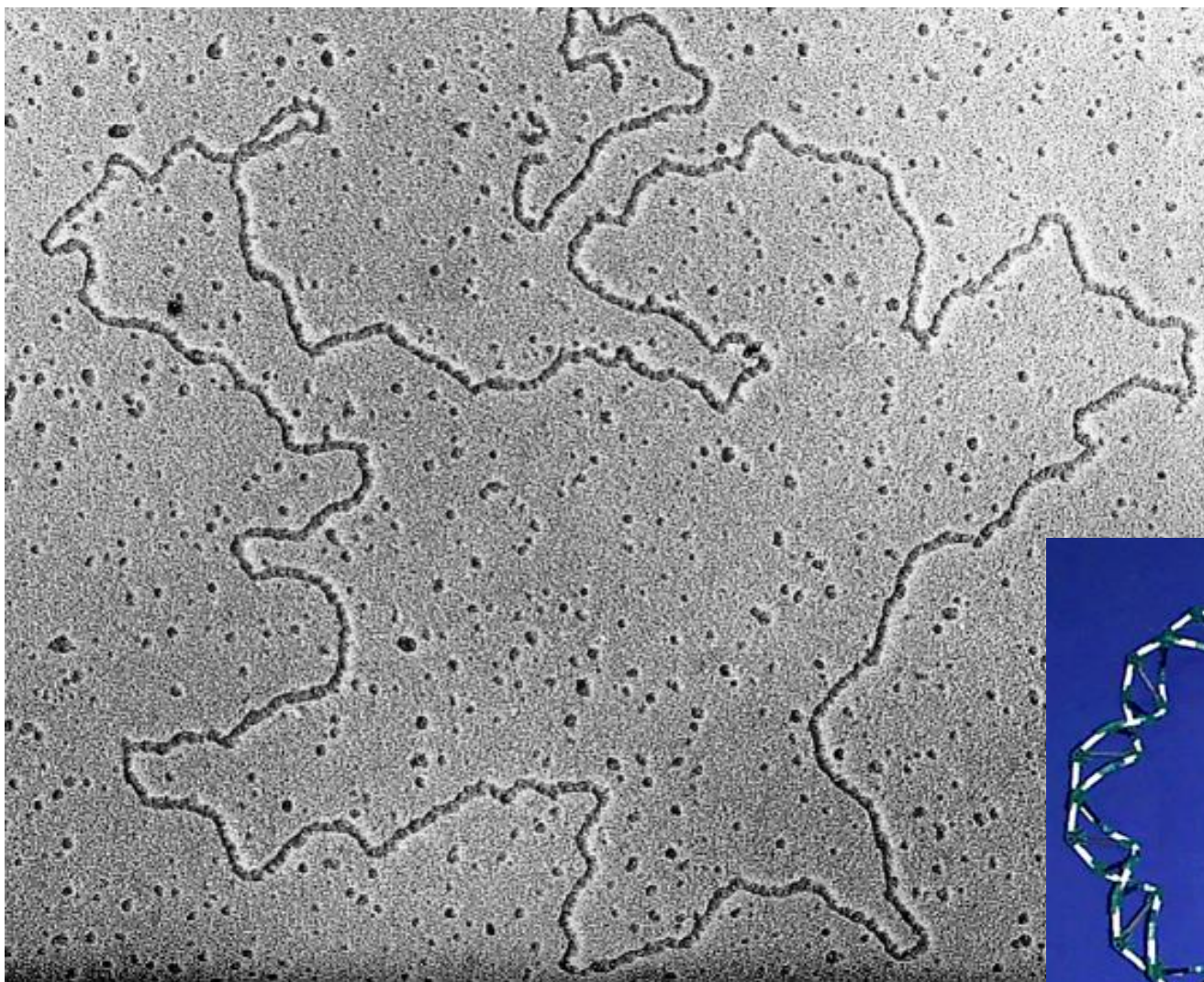
- Plasmídeos são moléculas de DNA circular, fita dupla, extracromossômico, que ocorrem naturalmente em bactérias e algumas leveduras.

- pUC18
- pBR322
- pUP310

- Codificam genes não essenciais
- 1 a 200 kb
- 1 até 10.000 cópias/célula

Obs.: Utilizados para clonar fragmentos de até 9 kb

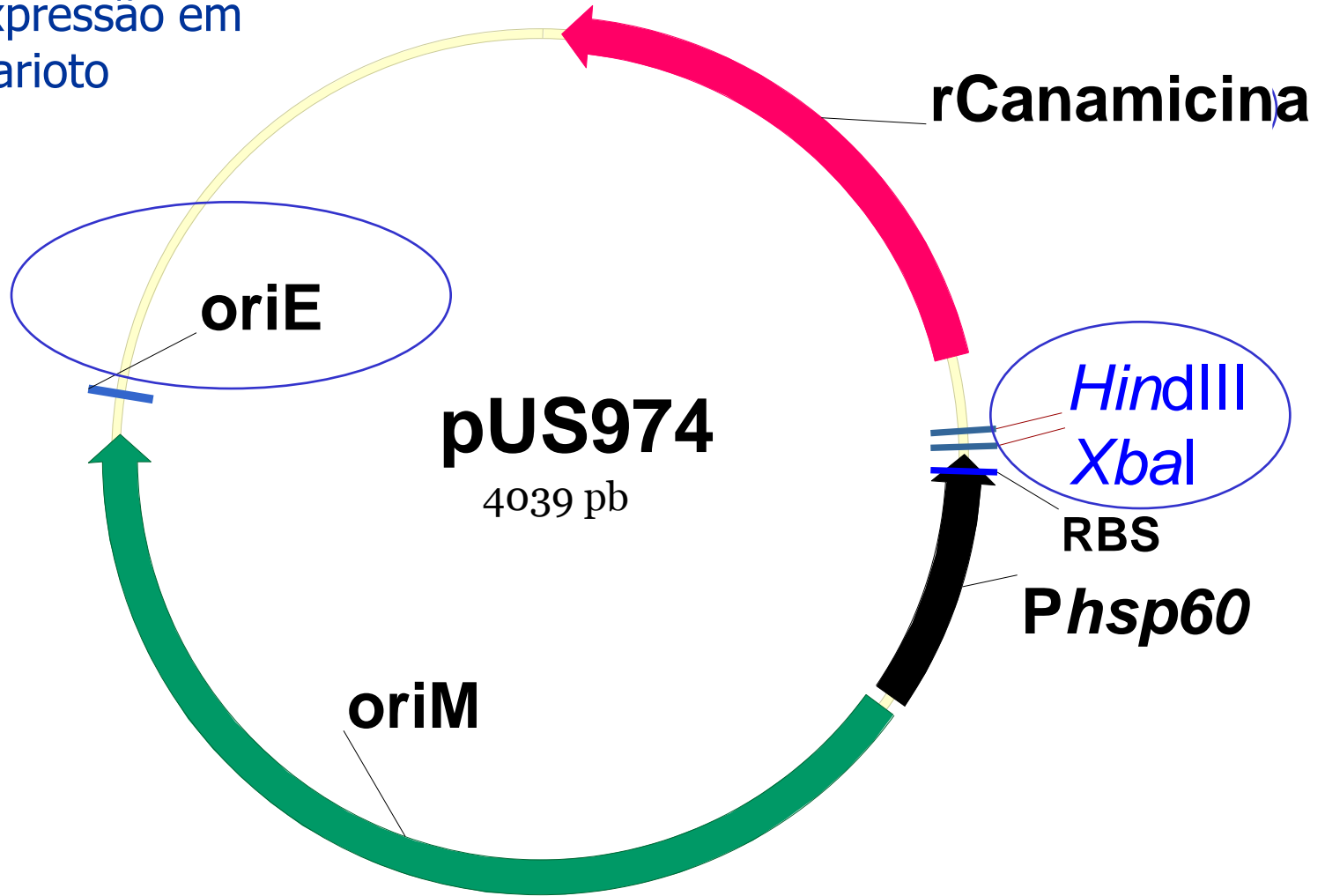




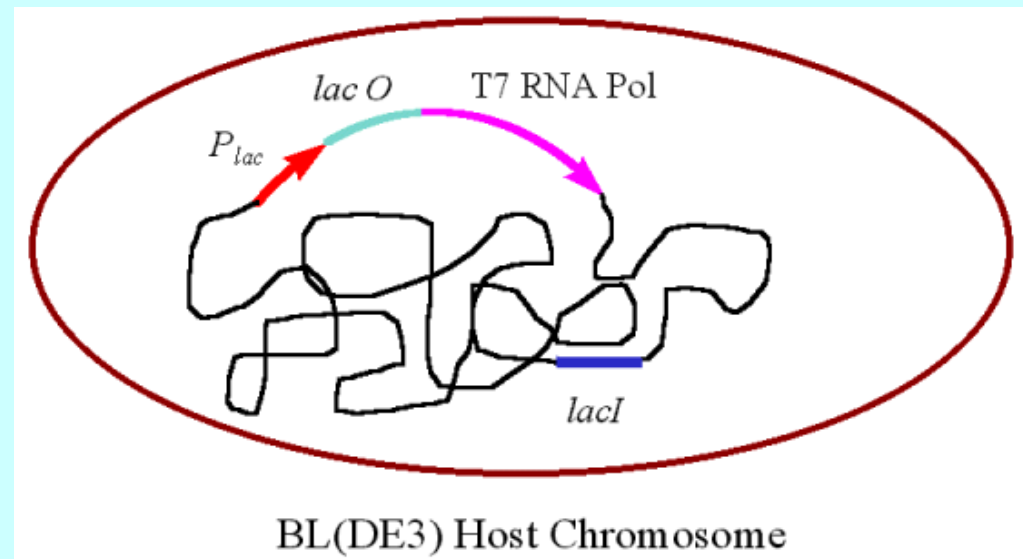
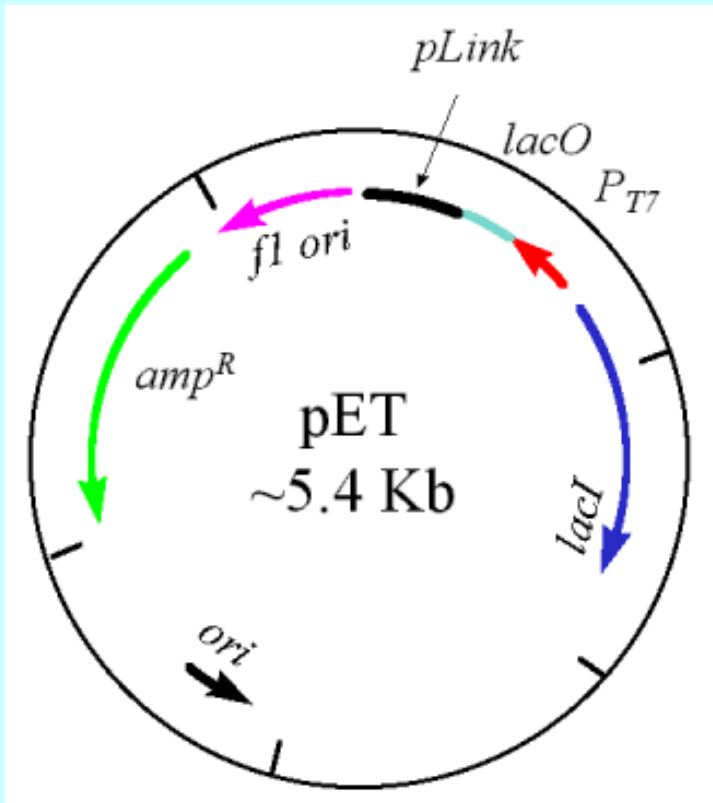
Plasmídeo



Vetor de Expressão em Procaríoto

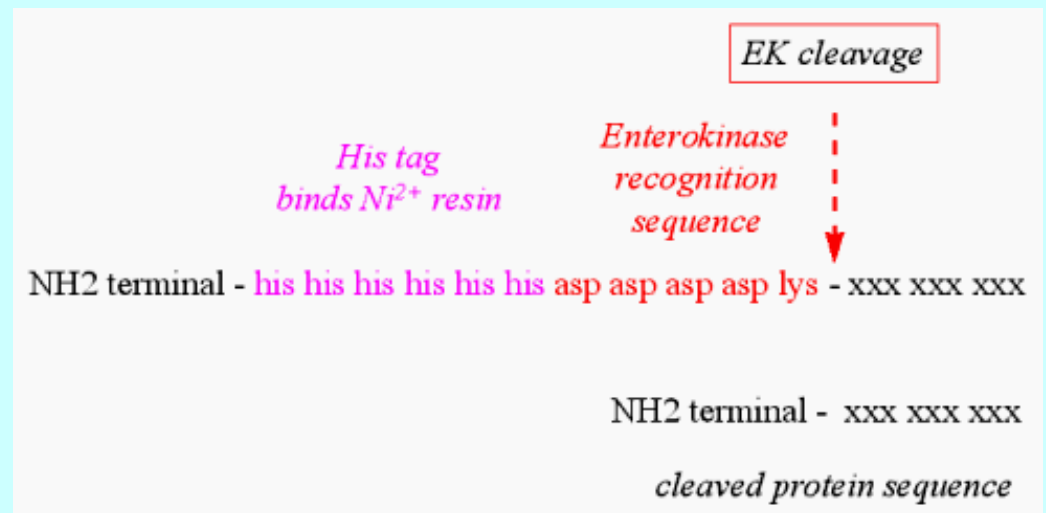
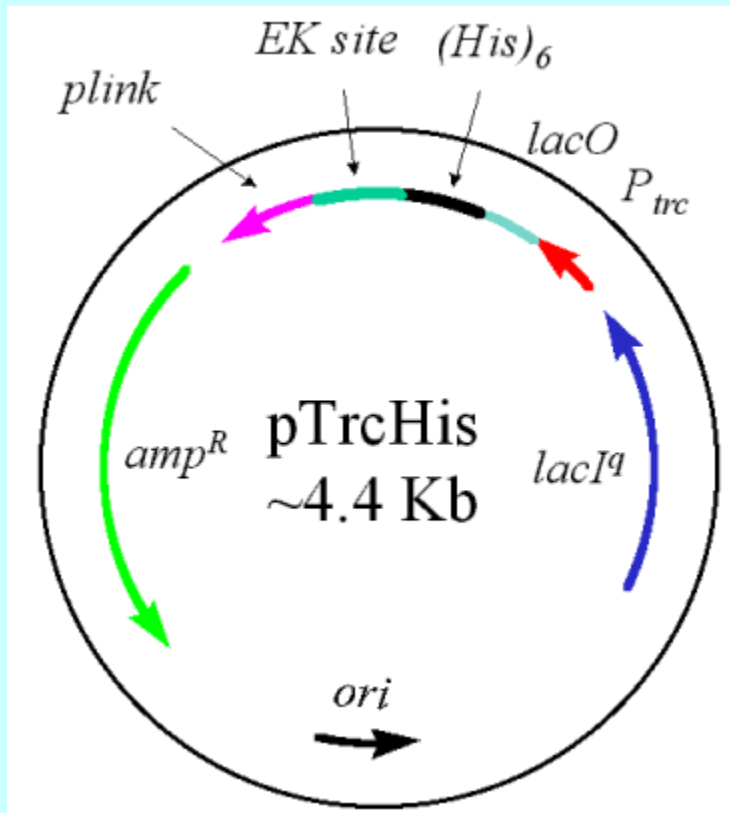


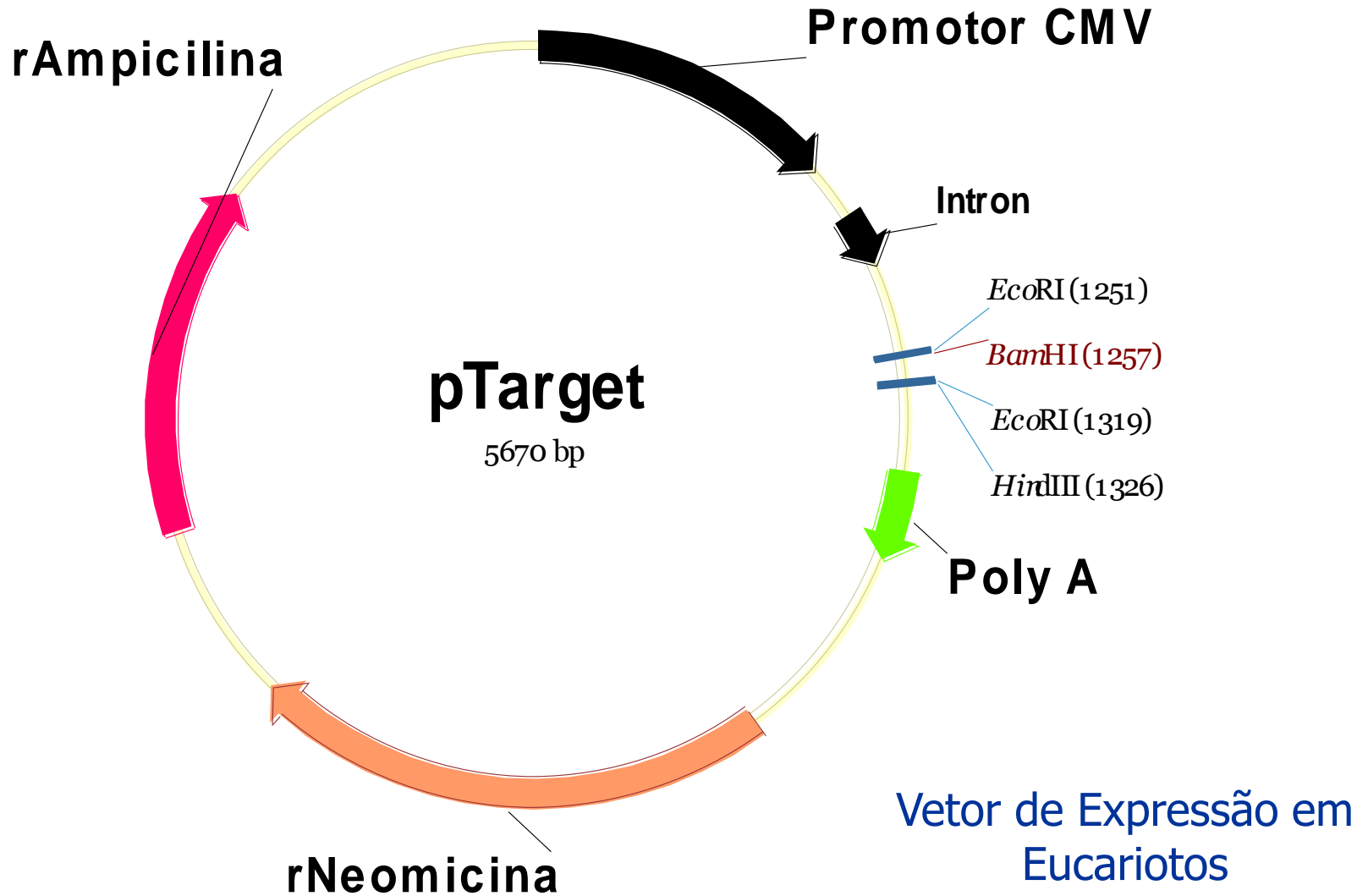
# Vetores da família pET (Novagen)



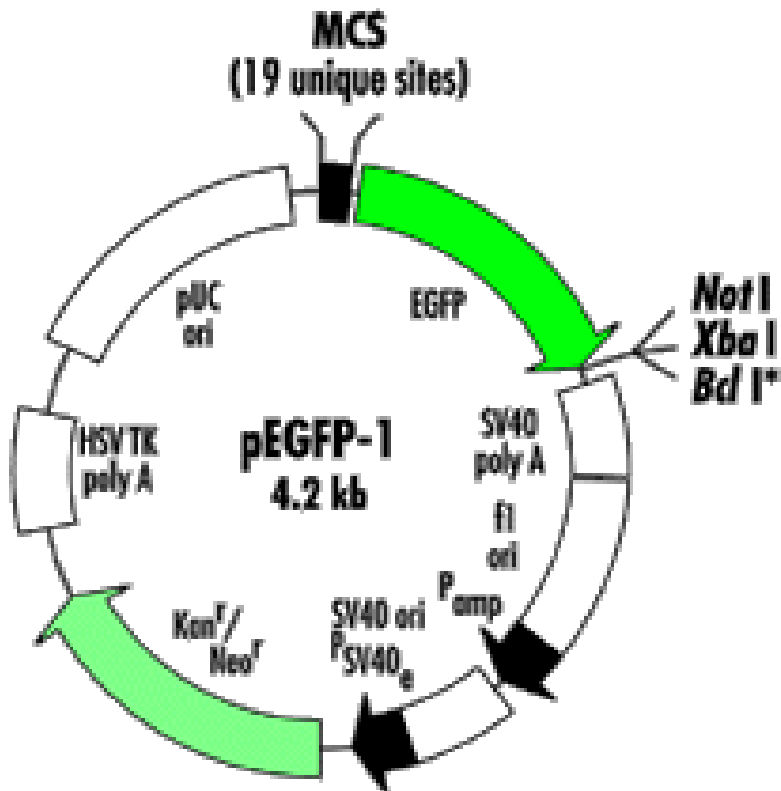
- **Altos níveis de expressão**
- **Promotor T7 é mais forte que o lac**
- **Controle rigoroso pelo *lacO***
- **Necessita de cepa de *E. coli* especial – BL21(DE3)**

# Vetor de expressão com cauda de histidina – purificação por cromatografia de afinidade com níquel



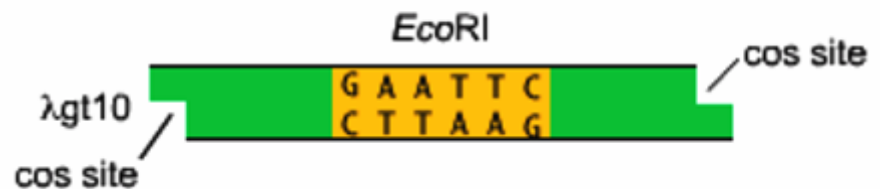
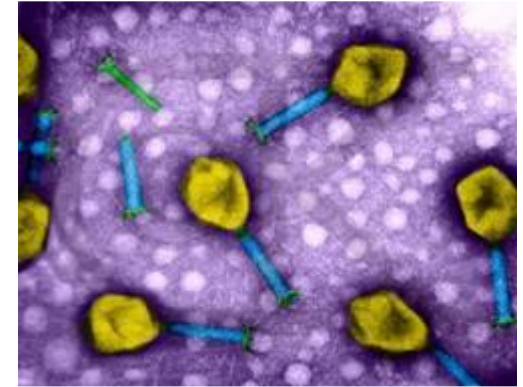


## Vetor de Expressão em Eucariotos

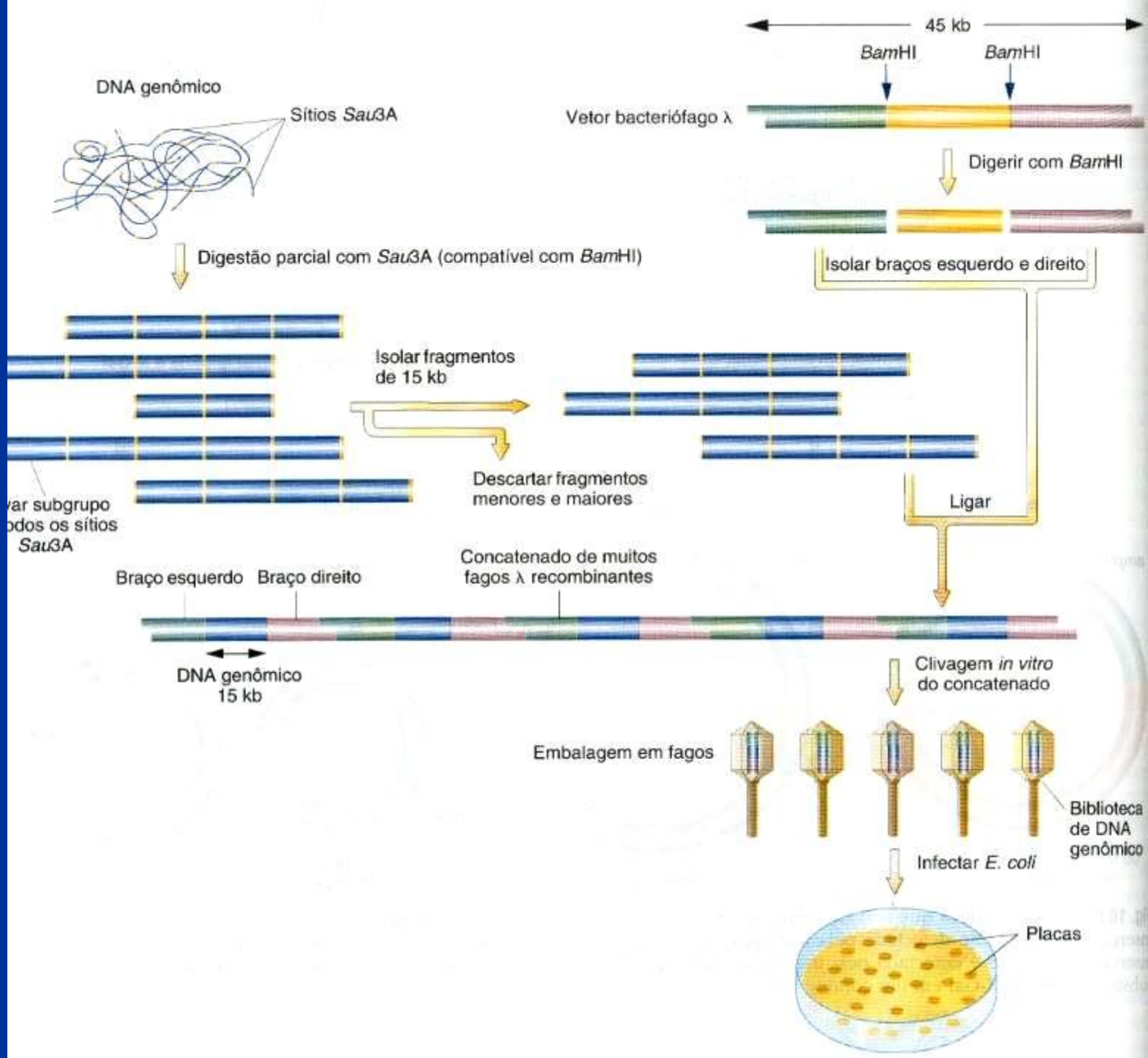




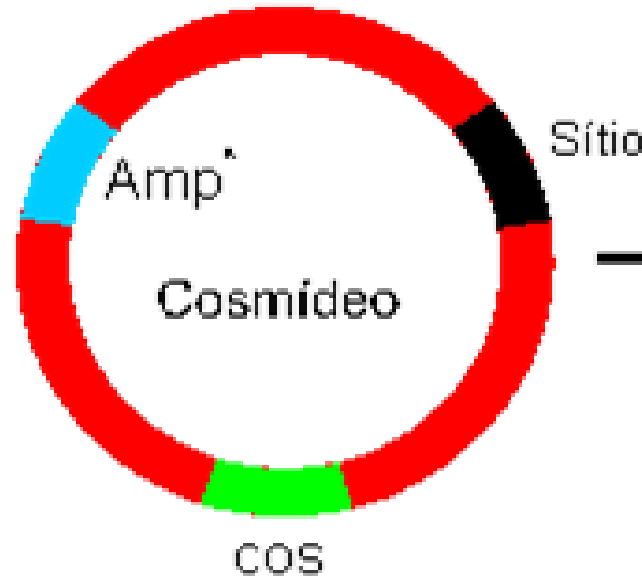
- Vírus que infectam bactérias;
- DNA ou RNA;
- Capsídeo
- Biologia do fago
- Utilizados para clonar fragmentos de 9 kb a 25 kb



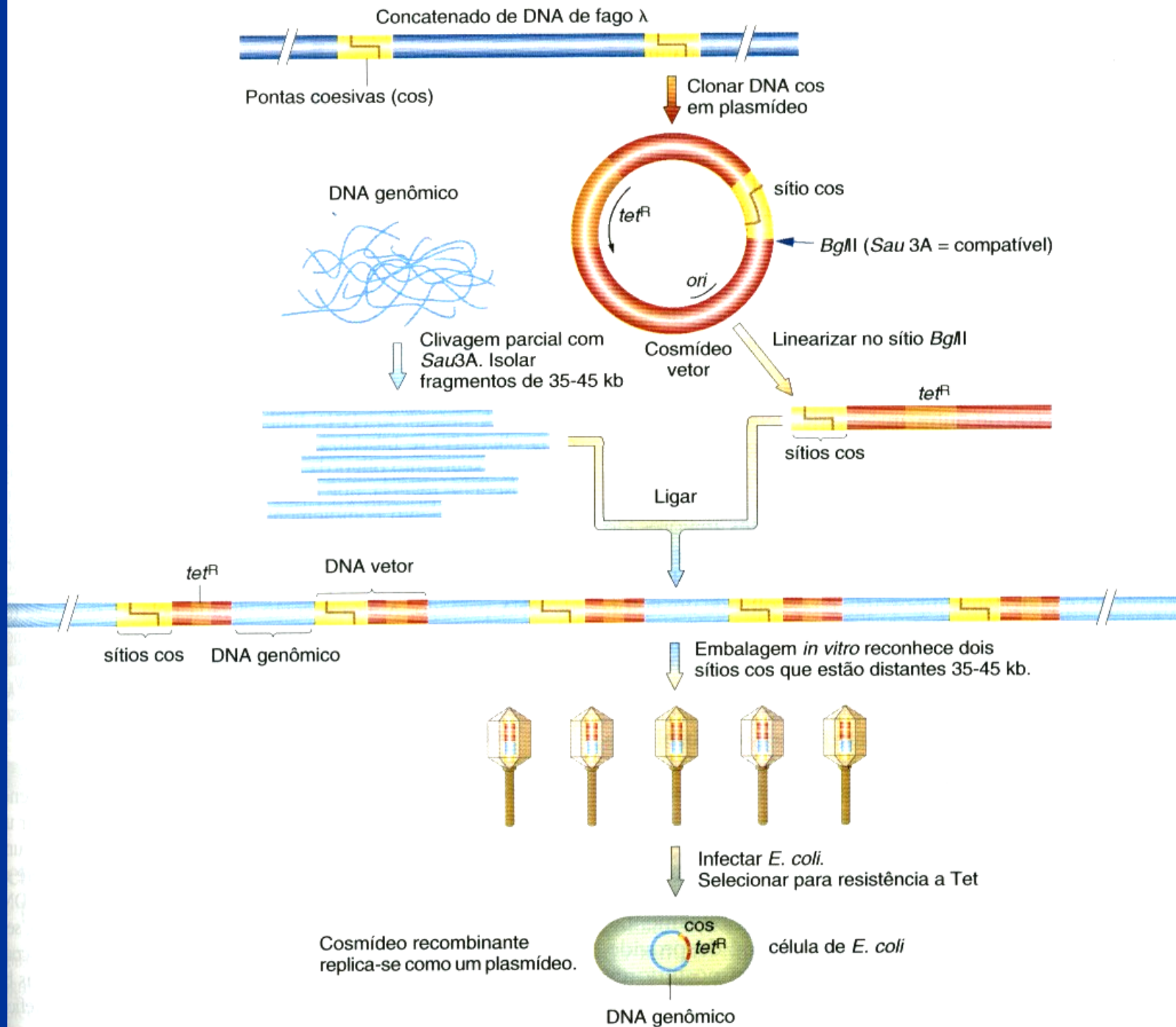
# Bacteriófagos



- São híbridos entre plasmídios e bacteriófagos;
- Utilizados para clonar fragmentos de 25 a 35 kb;



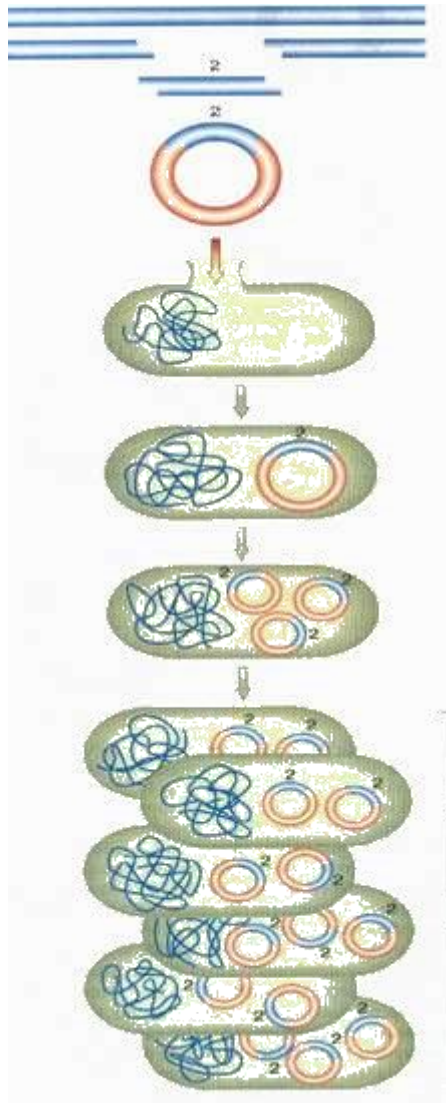
# Cosmídeos



- Replicação autônoma
- Marcador de seleção (antibiótico)
- Sítio único de clonagem

- Necessitam de um promotor forte, de um RBS e de ATG
- Promotores induzíveis
- Sinais de secreção
- Fusão com proteínas carreadoras

# CLONAGEM MOLECULAR



- É o isolamento e a propagação em um organismo de moléculas idênticas de DNA

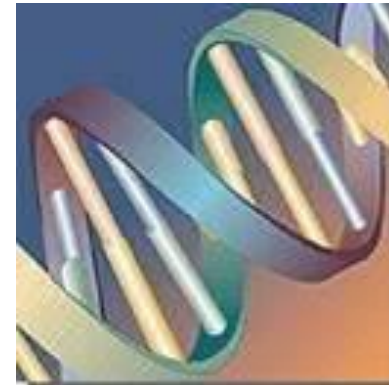


# CONSTRUÇÃO DE UM MICRORGANISMO RECOMBINANTE

1. Obtenção do DNA a ser clonado
2. Preparação do vetor
3. Ligação do vetor com o "inserto"
4. Transformação da bactéria
5. Seleção dos clones recombinantes

# 1. Obtenção do DNA a ser clonado

- Extração de DNA;
- PCR
- Digestão
- Purificação





# 1. Obtenção do DNA a ser clonado

**94 °C por 5 min**

**94 °C por 1 min**

**55 °C por 1 min**

**72 °C por 1 min**

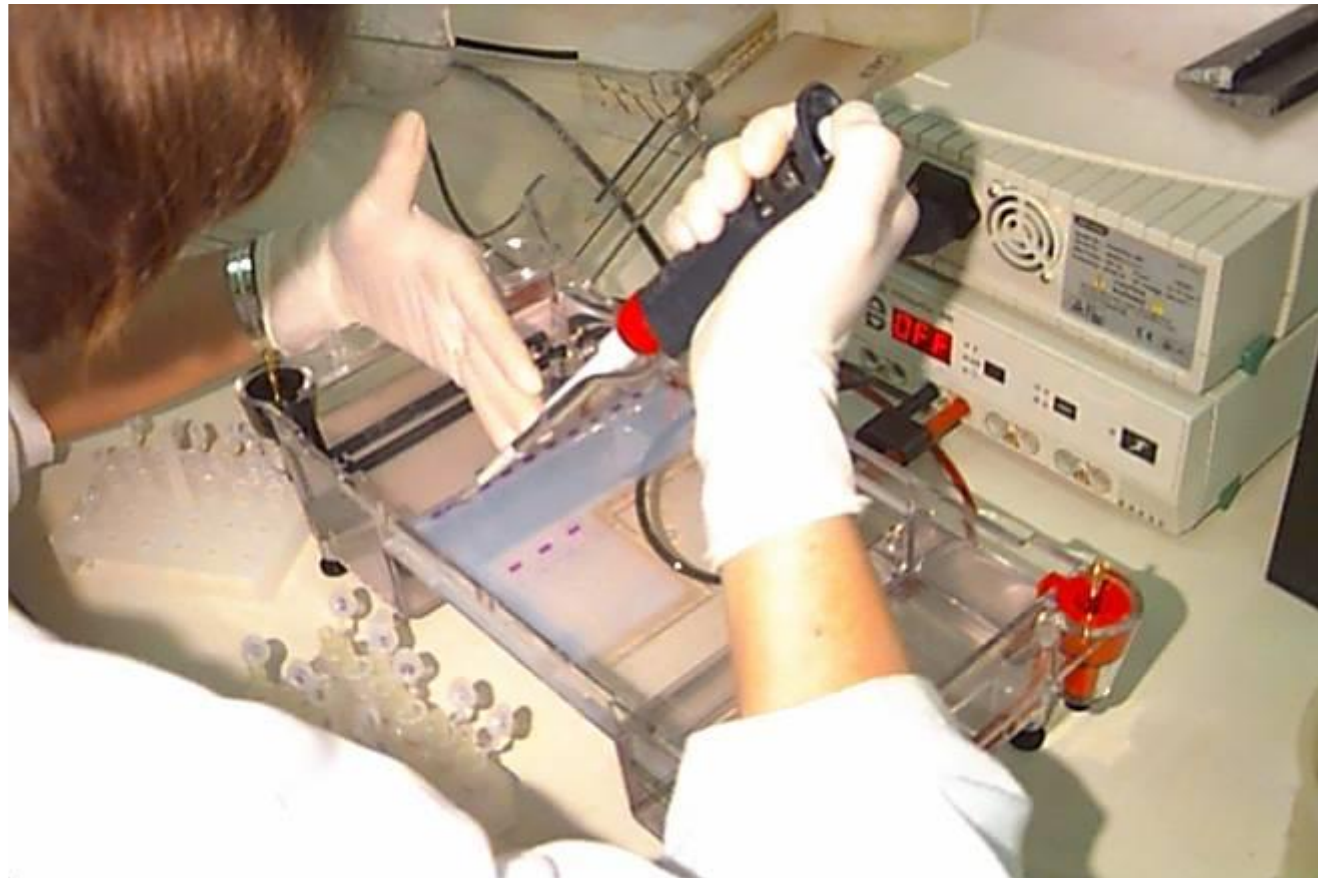
**72 °C por 5 min**

**4 °C**

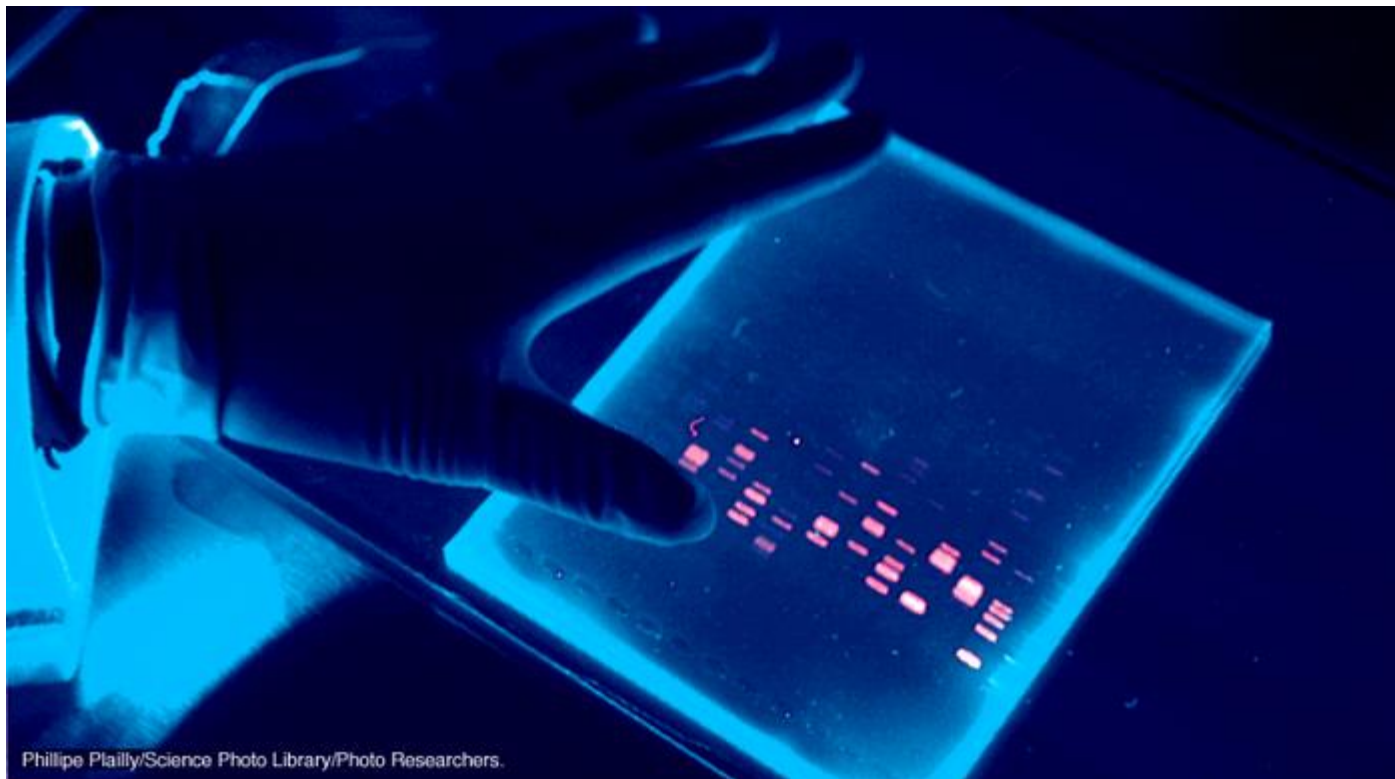
PCR



# Eletroforese em gel de agarose

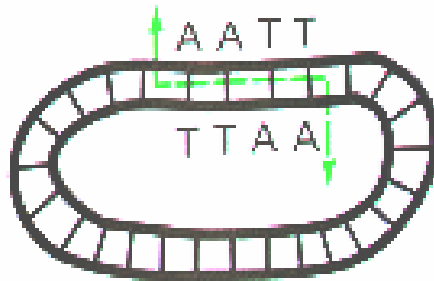


# Visualização do DNA em luz ultravioleta



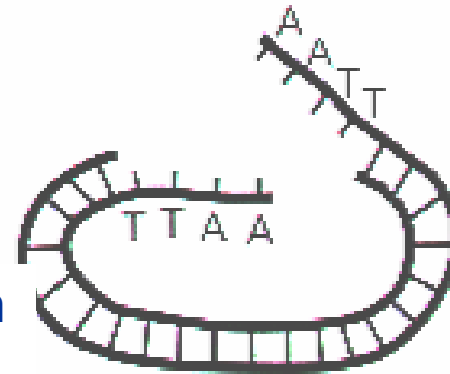
# 3.Preparação do vetor

Plasmídeo Circular

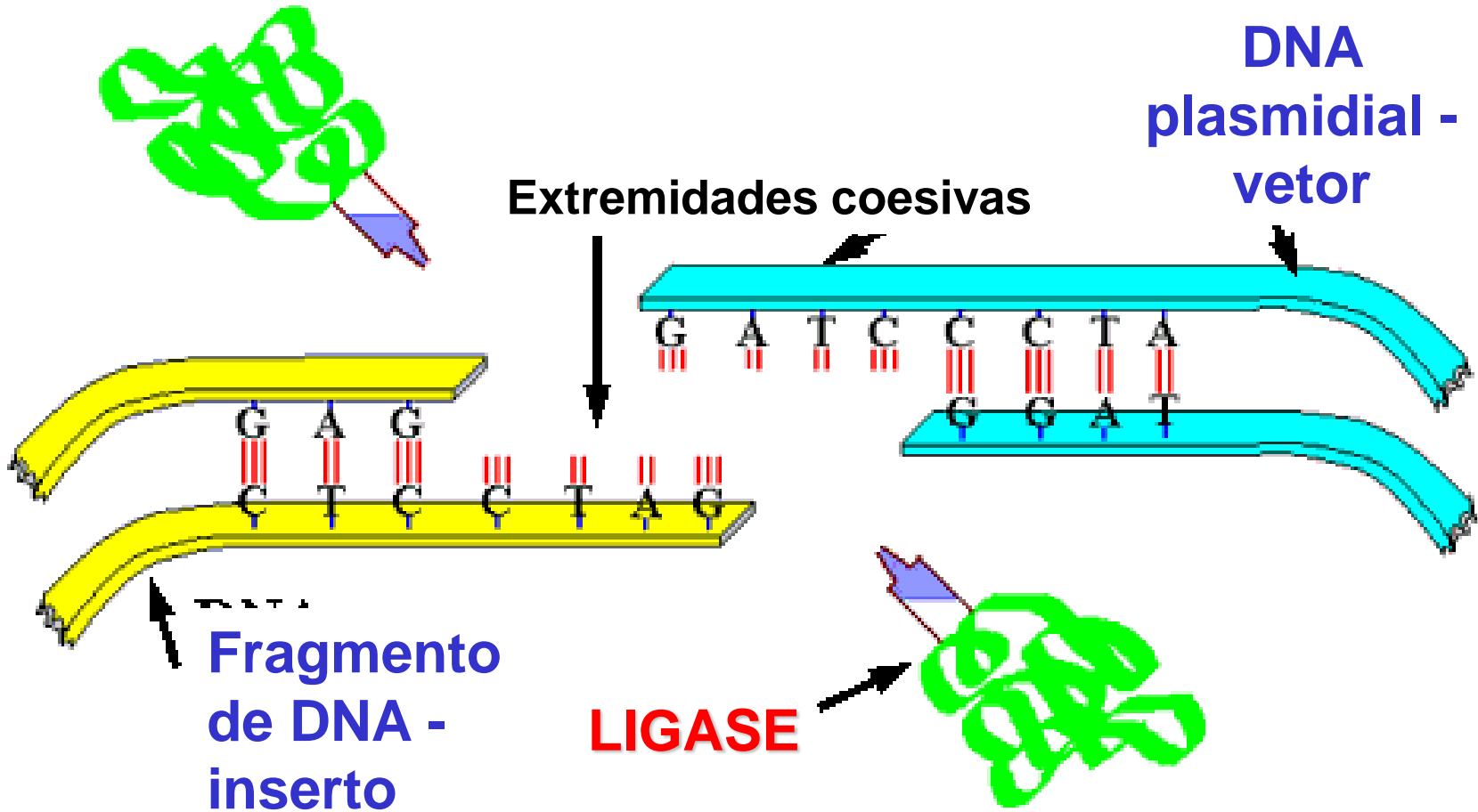


Digestão com  
Enzimas de  
restrição

Plasmídeo linear



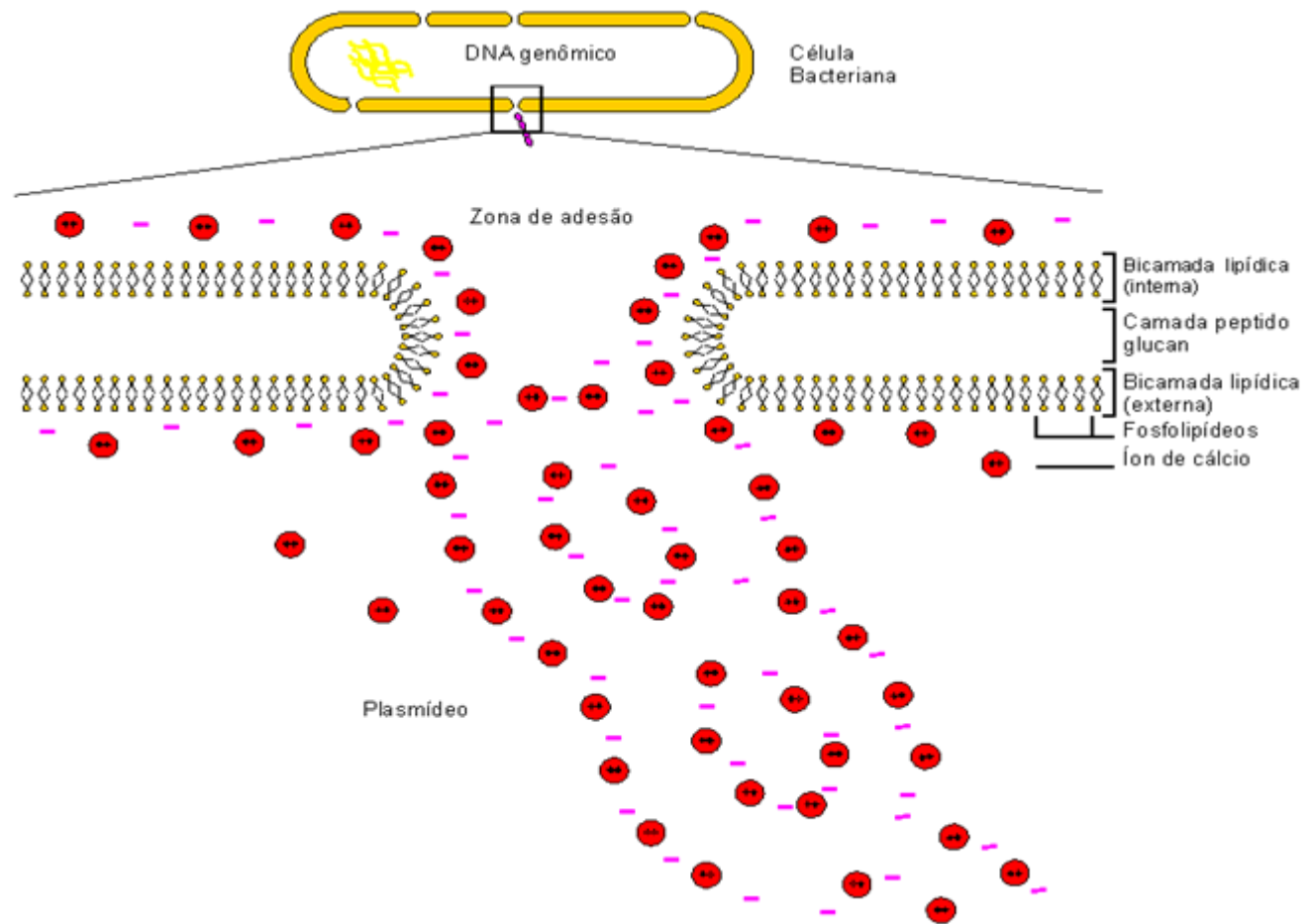
# 4. Ligação





# 5. Transformação da bactéria

**CHOQUE TÉRMICO**



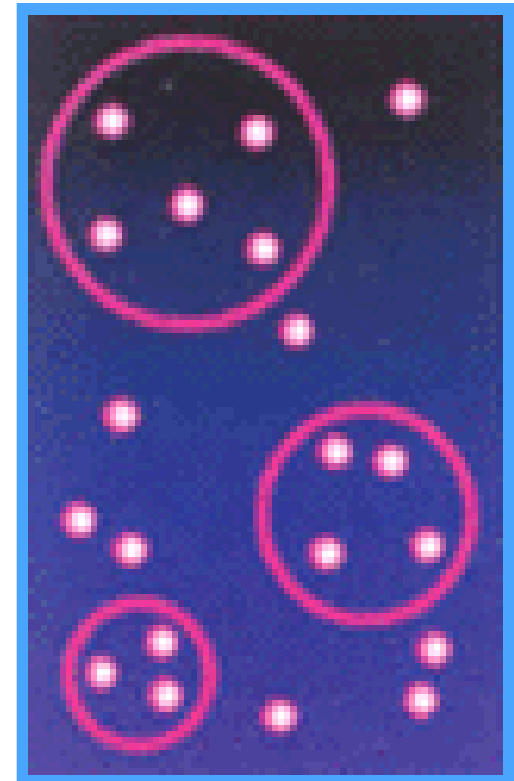
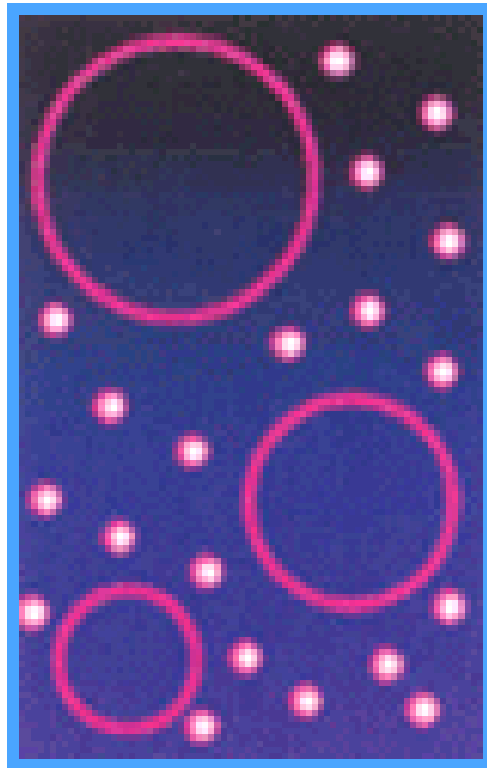
# 5. Transformação da bactéria

**ELETROPORAÇÃO**

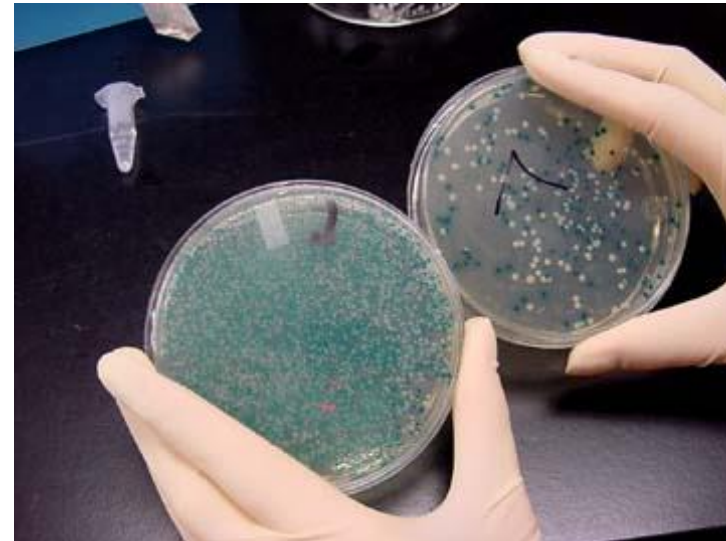


# 5. Transformação da bactéria

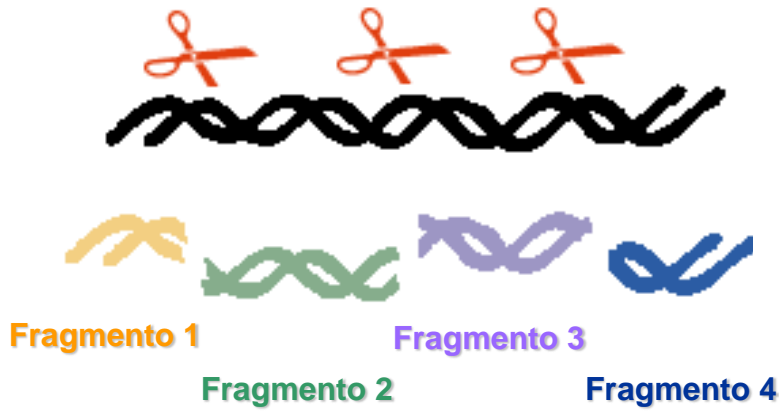
**ELETROPORAÇÃO**



# 6. Seleção dos clones recombinantes

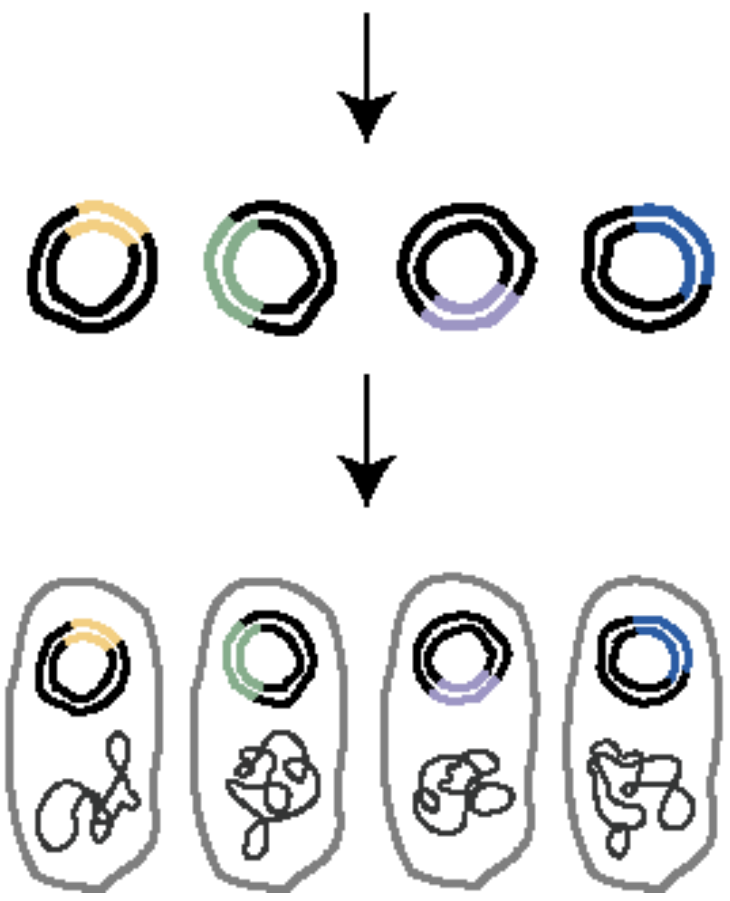


# RESUMINDO...



**Cortar o DNA com enzimas de restrição**

**Inserir fragmentos em vetores**

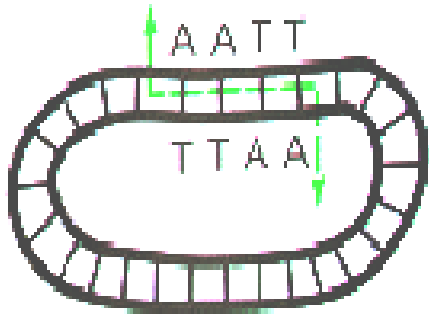


**Introduzir vetores em bactérias por:**

**eletroporação ou choque térmico**

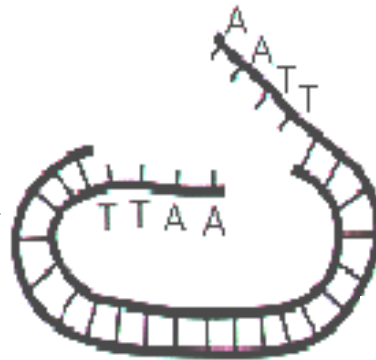
# Construção do DNA Recombinante

Molécula de DNA de um plasmídeo **circular**



Clivagem com enzima de restrição

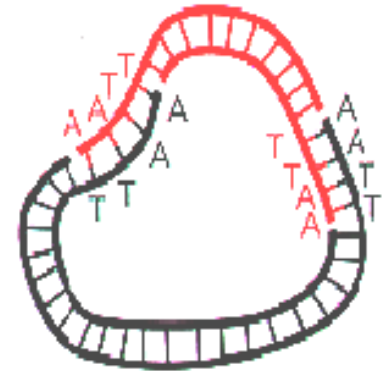
Molécula de DNA de um plasmídeo **linear** com extremidades coesivas



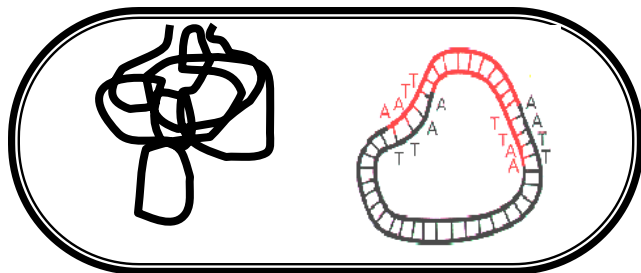
anelamento



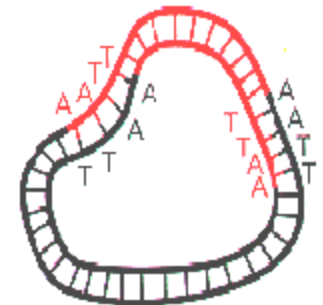
Ligação covalente pela DNA ligase



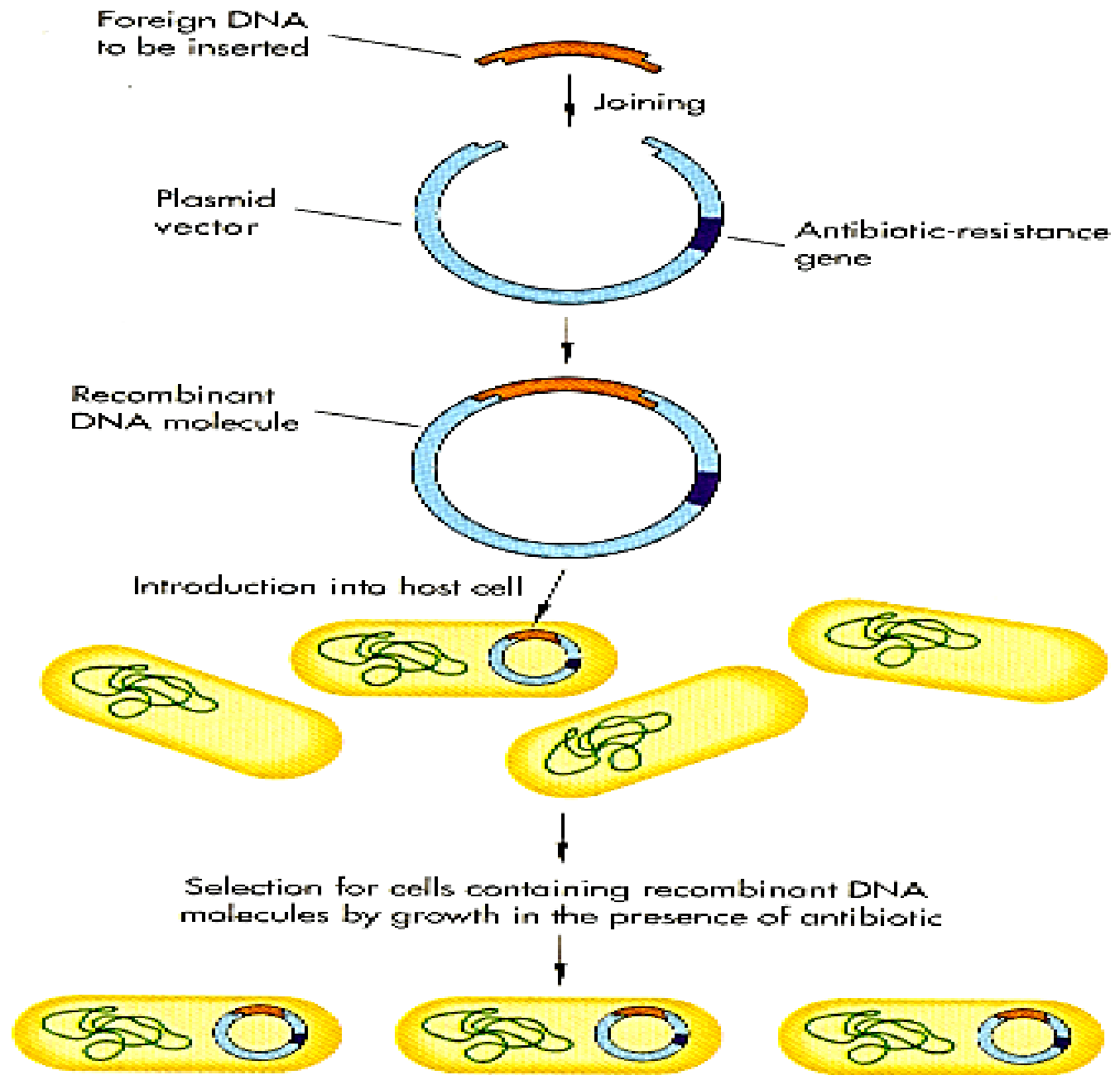
Inserção em uma célula hospedeira



Molécula de DNA plasmidial contendo o **inserto**



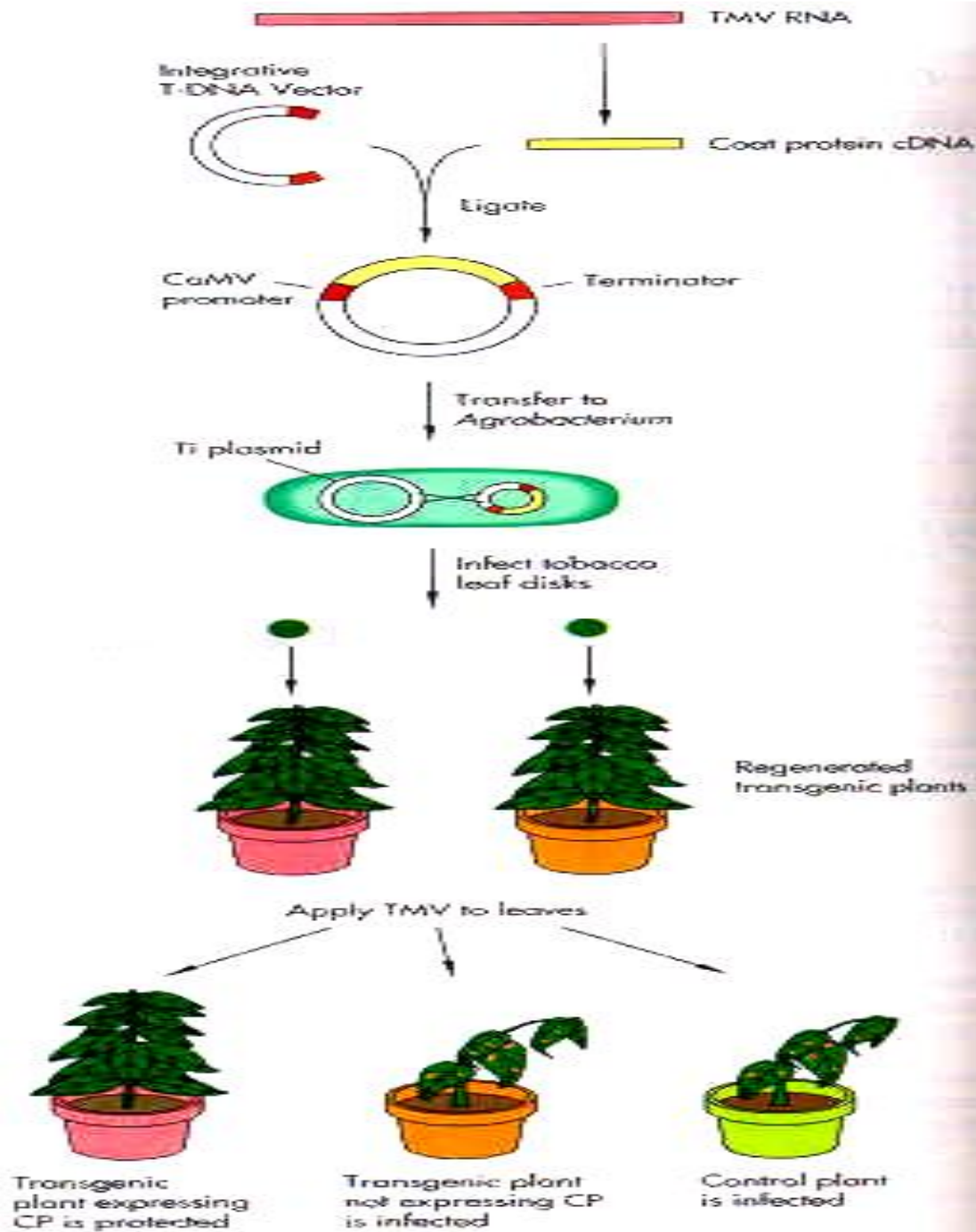
# MICROORGANISMO RECOMBINANTE



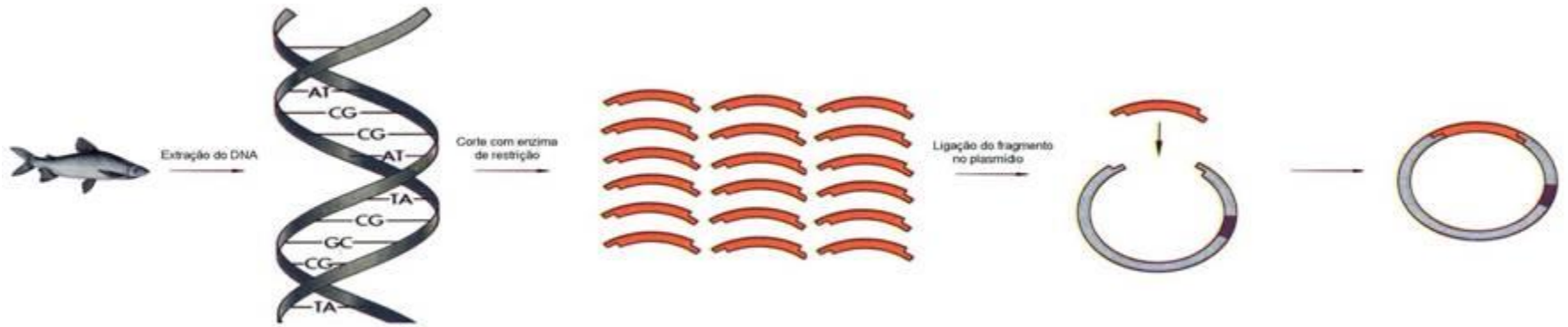
**FIGURE 5-11**  
The cloning of DNA in a plasmid.



# PLANTAS TRANSGÊNICAS



# PEIXES TRANSGÊNICOS



*FRANK & ERNEST*

Thaves

