



Genômica II

Sibele Borsuk
sibele@ufpel.tche.br

Bancos de DNA

Bancos de DNA

- É uma coleção de clones que representam a totalidade do genoma de um determinado organismo
- Consiste de todas as moléculas de DNA recombinantes que foram geradas pela ligação do DNA do organismo a um vetor (plasmídeo, bacteriófago ou cosmídeo)
- Servem para isolar DNA específicos de um organismo

Características dos Bancos de DNA

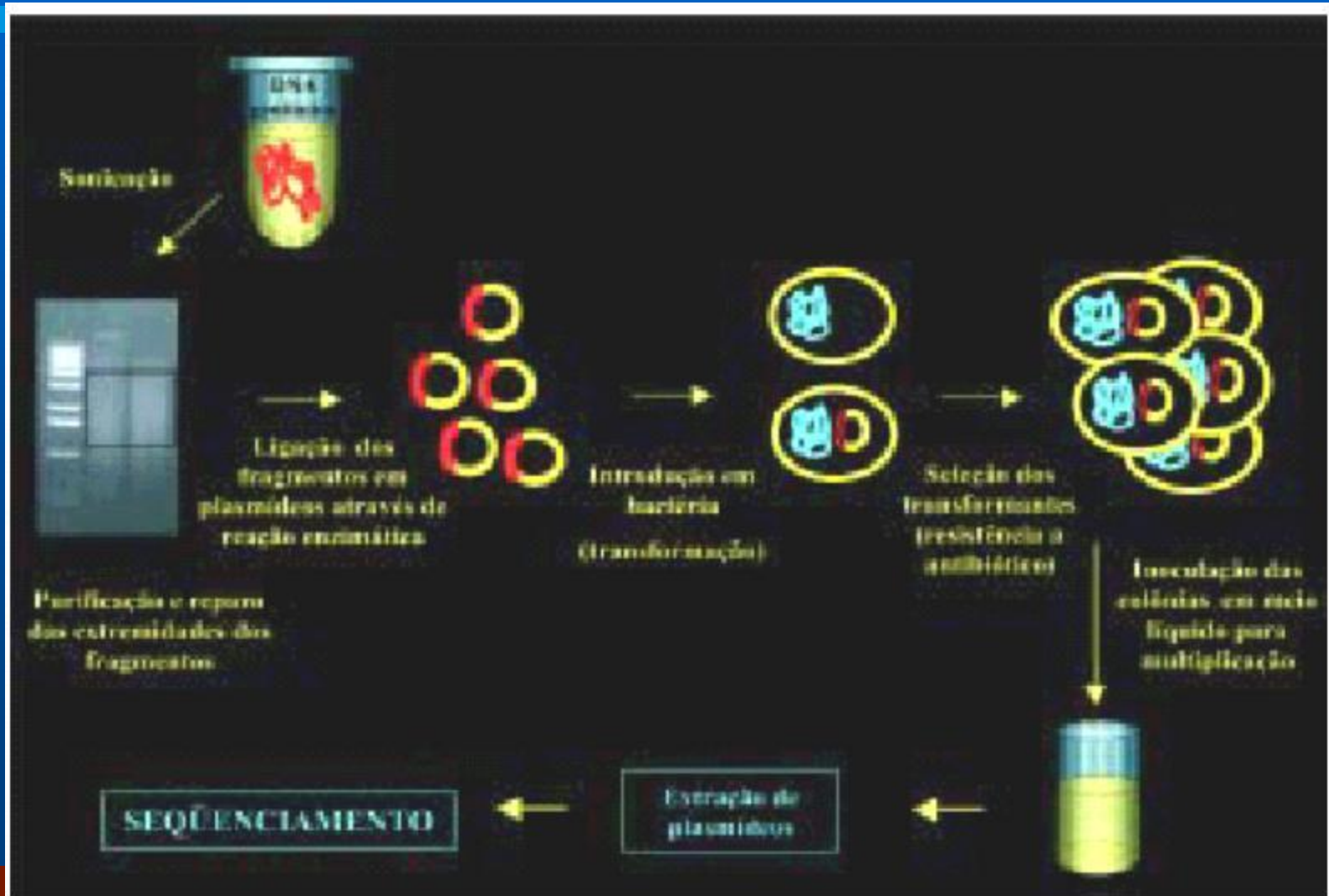
- São usadas principalmente para procariotos
- Em eucariotos usa-se biblioteca genômica para estudo de regiões reguladoras
- Independe do tipo de célula utilizada para a obtenção do DNA

Tipos de Bancos de DNA

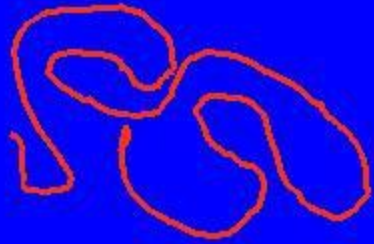
- **Biblioteca Genômica-** fragmentos de DNA
- **Biblioteca de cDNA-** mRNA

Biblioteca Genômica

- Representa todo o genoma de um organismo

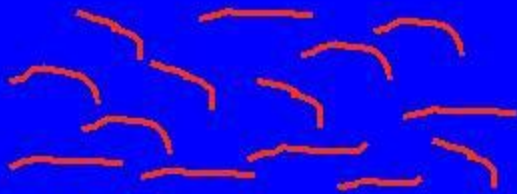


Biblioteca Genômica

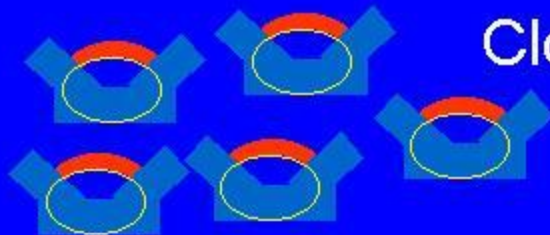


DNA genômico

digestão parcial com enzimas de restrição ou mecanicamente: sonicação ou nebulização

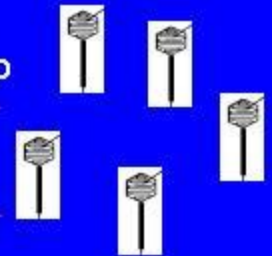


Fragmentos



Clonagem em vetores

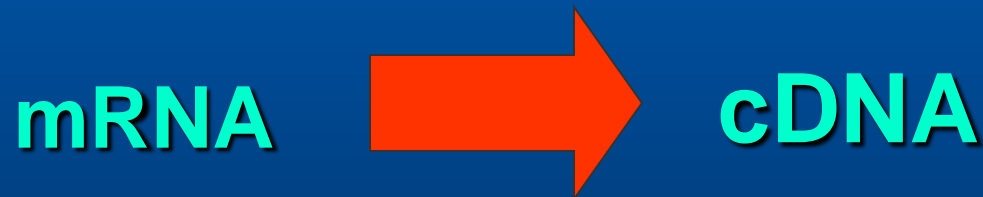
Empacotamento in vitro



Inserção dos vetores nas células hospedeiras

EM EUKARIOTOS

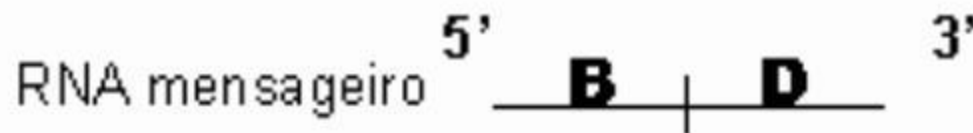
- Pequena porcentagem do genoma codifica



Biblioteca de cDNA

- É o conjunto de clones das seqüências codificadoras que estão sendo expressas pela célula naquele momento, obtido através da clonagem de moléculas cópias do mRNA.
- É usada principalmente para células eucarióticas.
- Varia de acordo com o tecido utilizado.

Biblioteca de cDNA



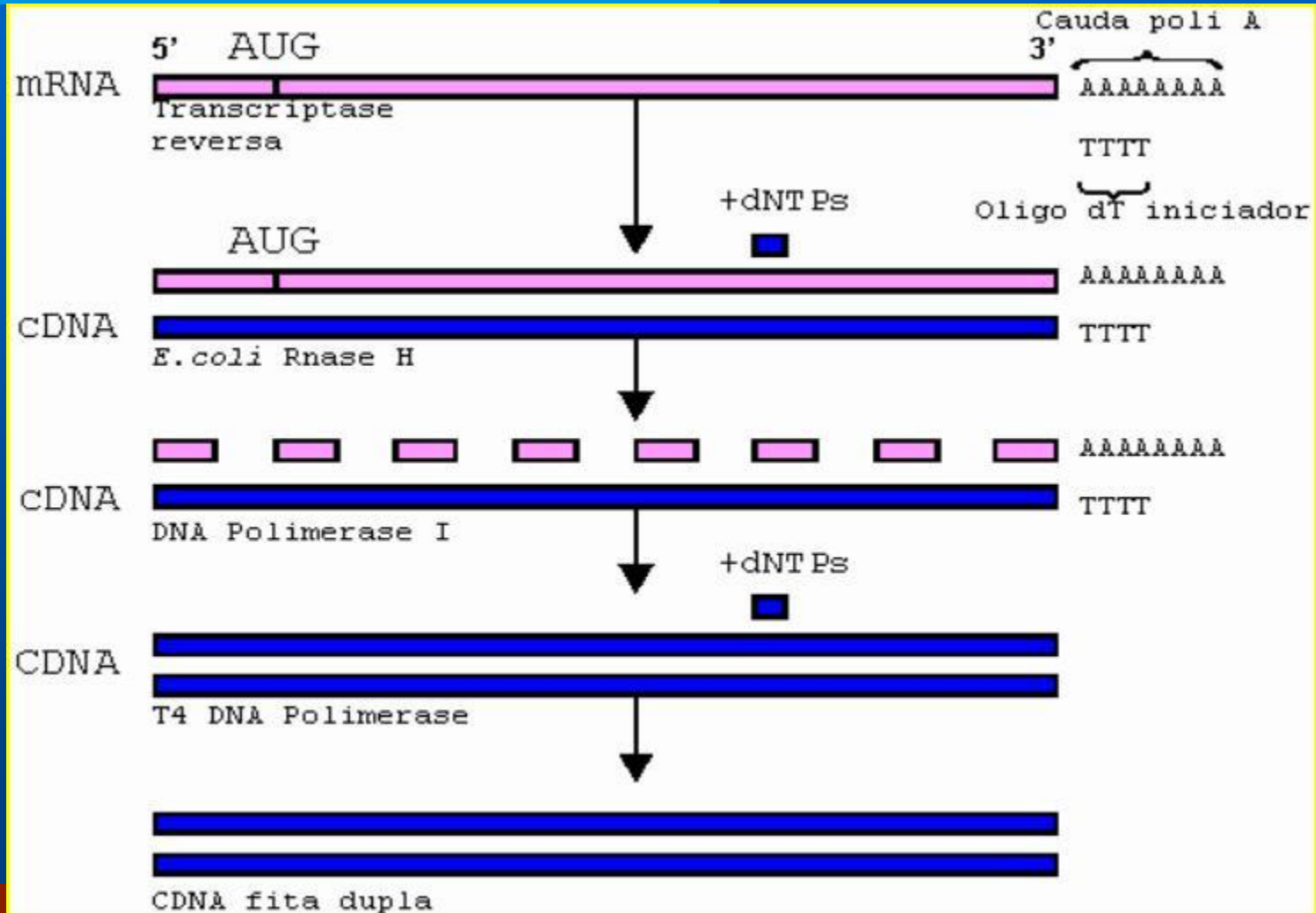
A e E = Sequências Flanqueadoras

B e D = exons

C = intron

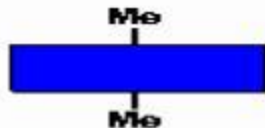
Biblioteca de cDNA

Síntese de cDNA fita dupla



Clonagem de cDNA em fago λ

1➡



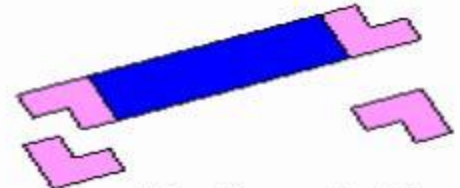
Metilação do cDNA para proteger os sítios internos de *Eco*RI

2➡



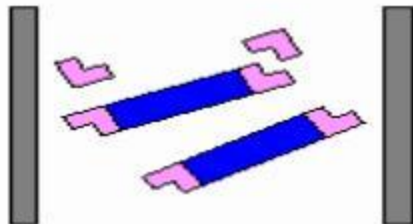
Ligação dos adaptadores *Eco*RI com o cDNA

3➡



Digestão com *Eco*RI para gerar sítios coesivos *Eco*RI

4➡



Separação do cDNA do excesso de adaptadores

5➡



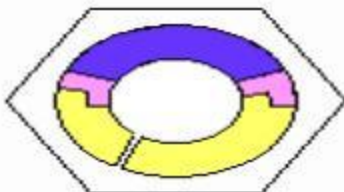
cDNA purificado

6➡



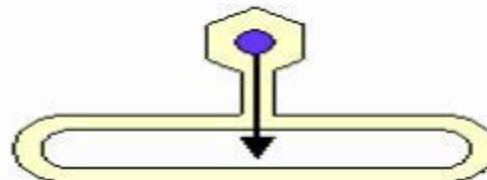
Ligação do cDNA dos braços do fago lambda

7➡



Empacotamento dos recombinantes com as proteínas formadoras da partícula viral

8➡

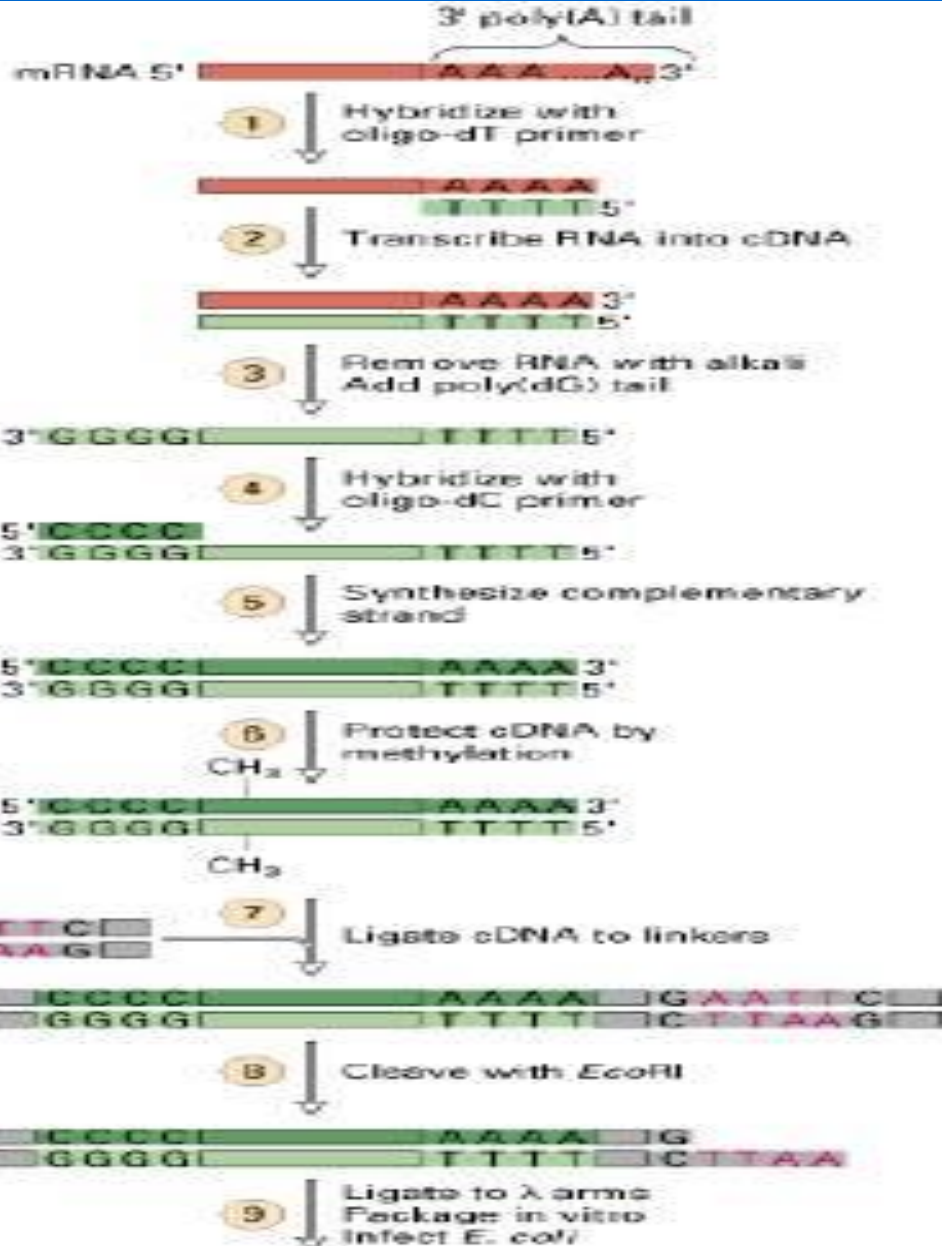


Injeção da bactéria hospedeira o fago recombinante

9➡

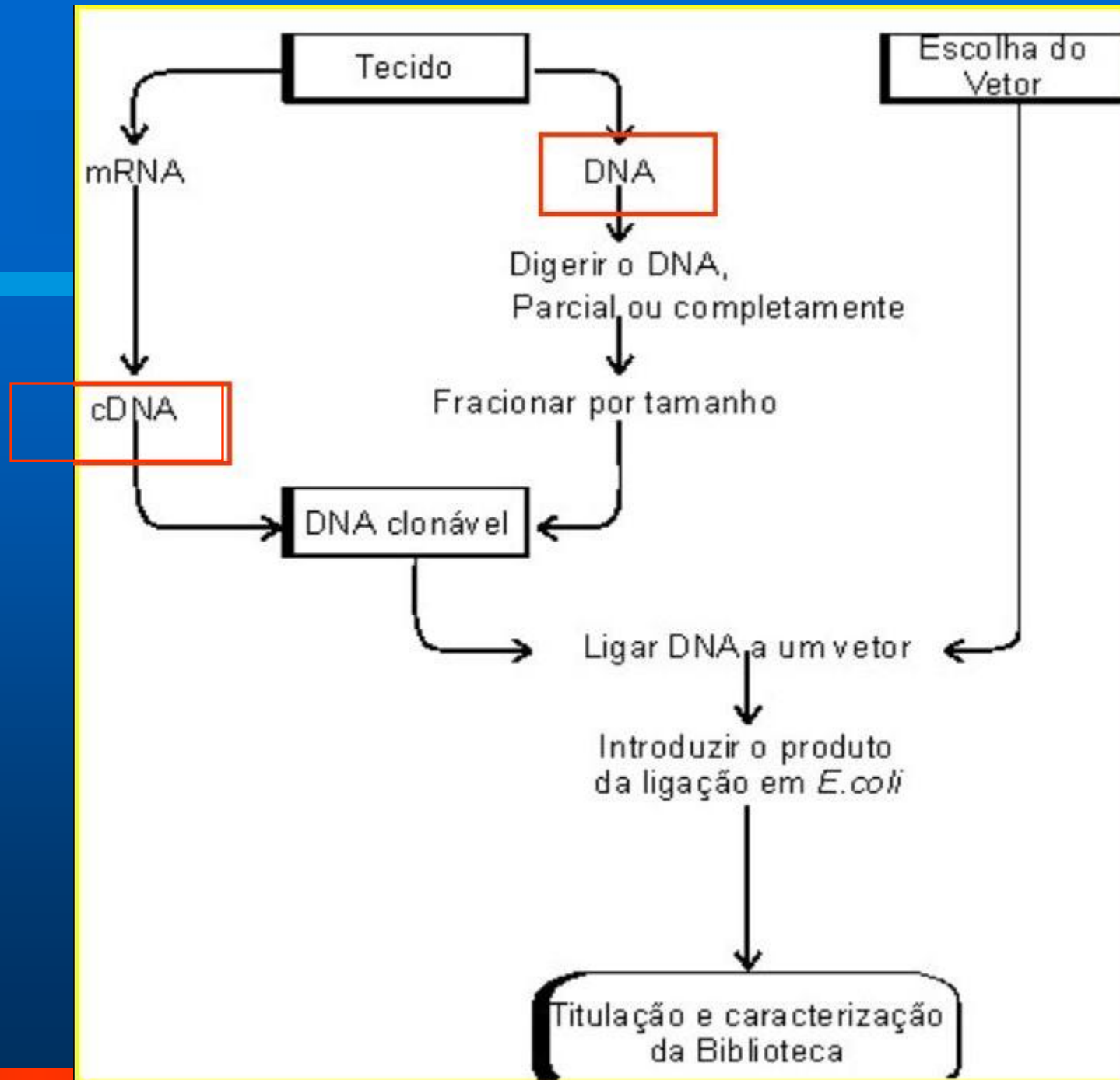


Plaqueamento dos recombinantes

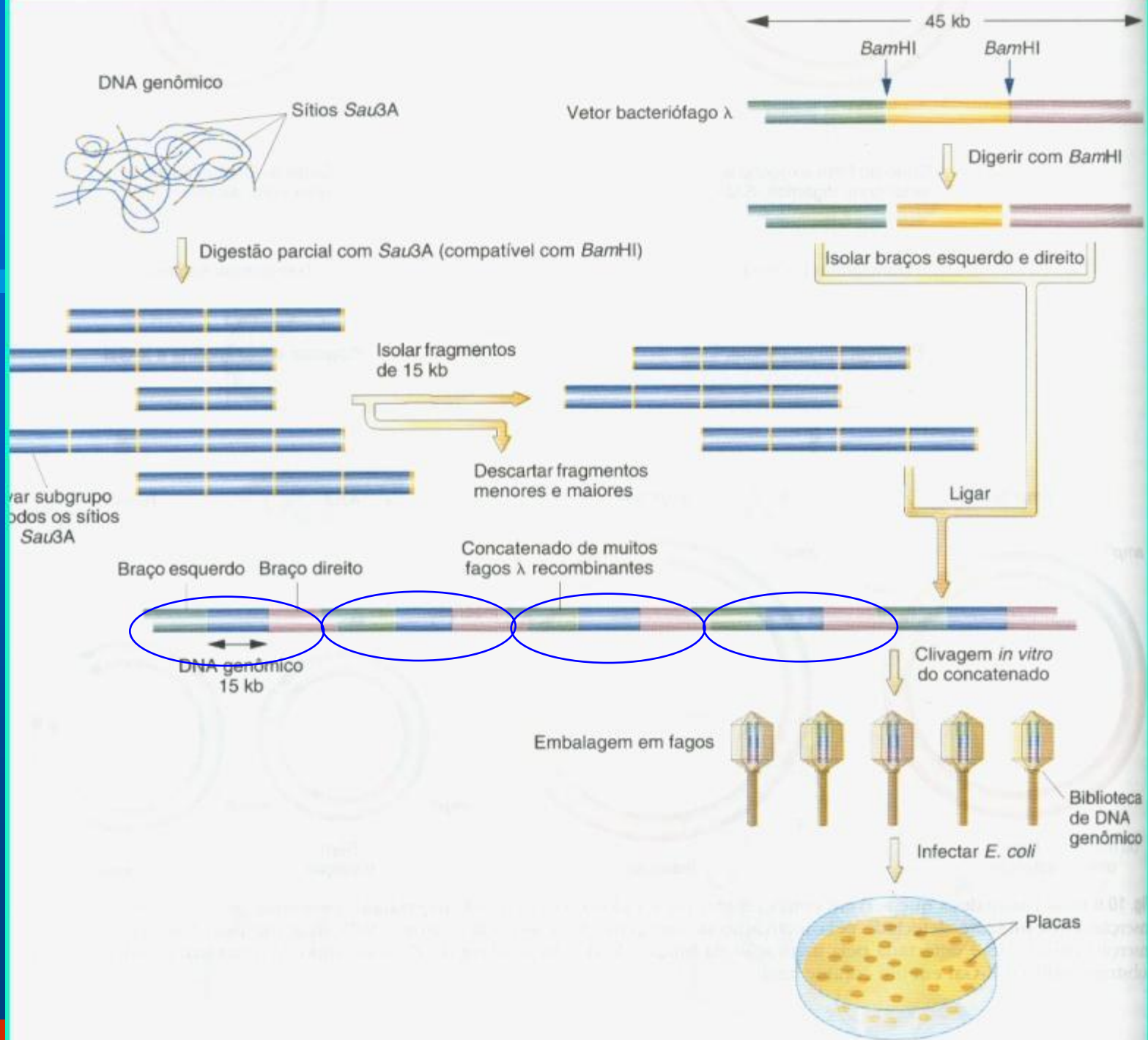


Clonagem de cDNA em fago λ

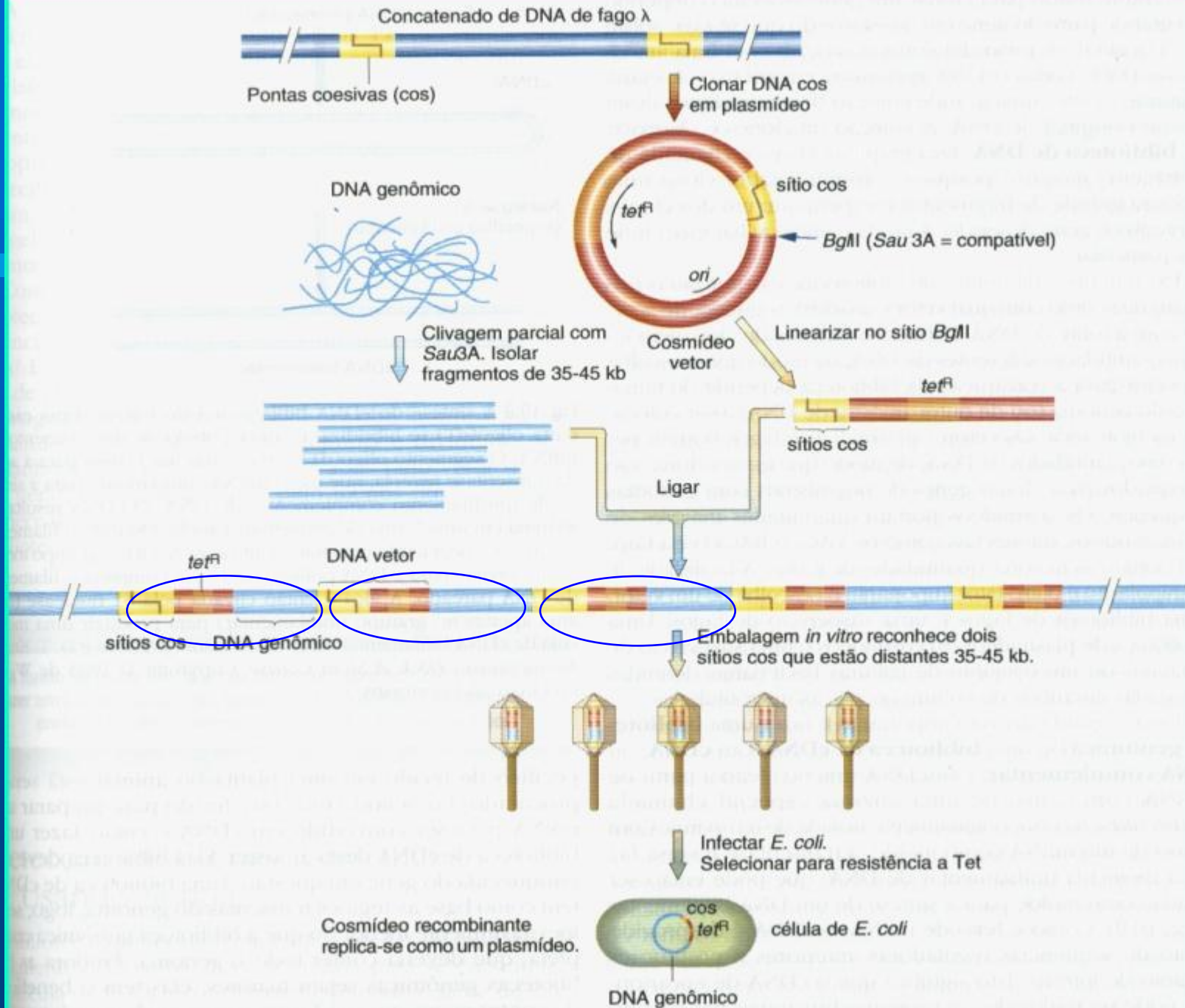
Etapas na construção de uma Biblioteca genômica e de cDNA



Bacteriófagos



Cosmídios



Diferenças entre biblioteca Genômica e de cDNA

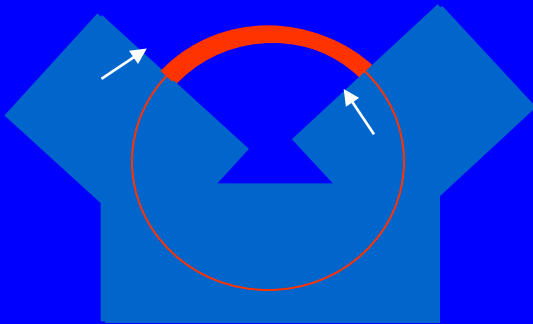
Biblioteca genômica:

- Representam uma amostra aleatória de todas as sequências de DNA de um organismo

Biblioteca de cDNA

- Contém moléculas que foram transcritas em mRNA
- Produção de grande quantidade de mRNA por células especializadas
- Varia de acordo com tipo e estado fisiológico da célula
- mRNA é processado

Utilização de bibliotecas

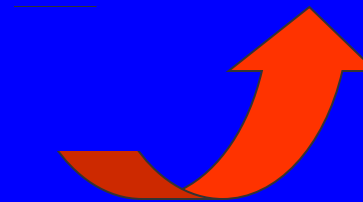


Screening

Sequenciamento de todos os insertos usando iniciadores do vetor



Projetos genoma / transcriptoma



Triagem de uma biblioteca

- **Detecção do produto do gene pela utilização de anticorpos- Western Blot**
- **Detecção do DNA através da técnica de hibridização- Southern Blot**

Triagem de uma biblioteca



Sonda de DNA

Conhecer parte da
sequência do gene



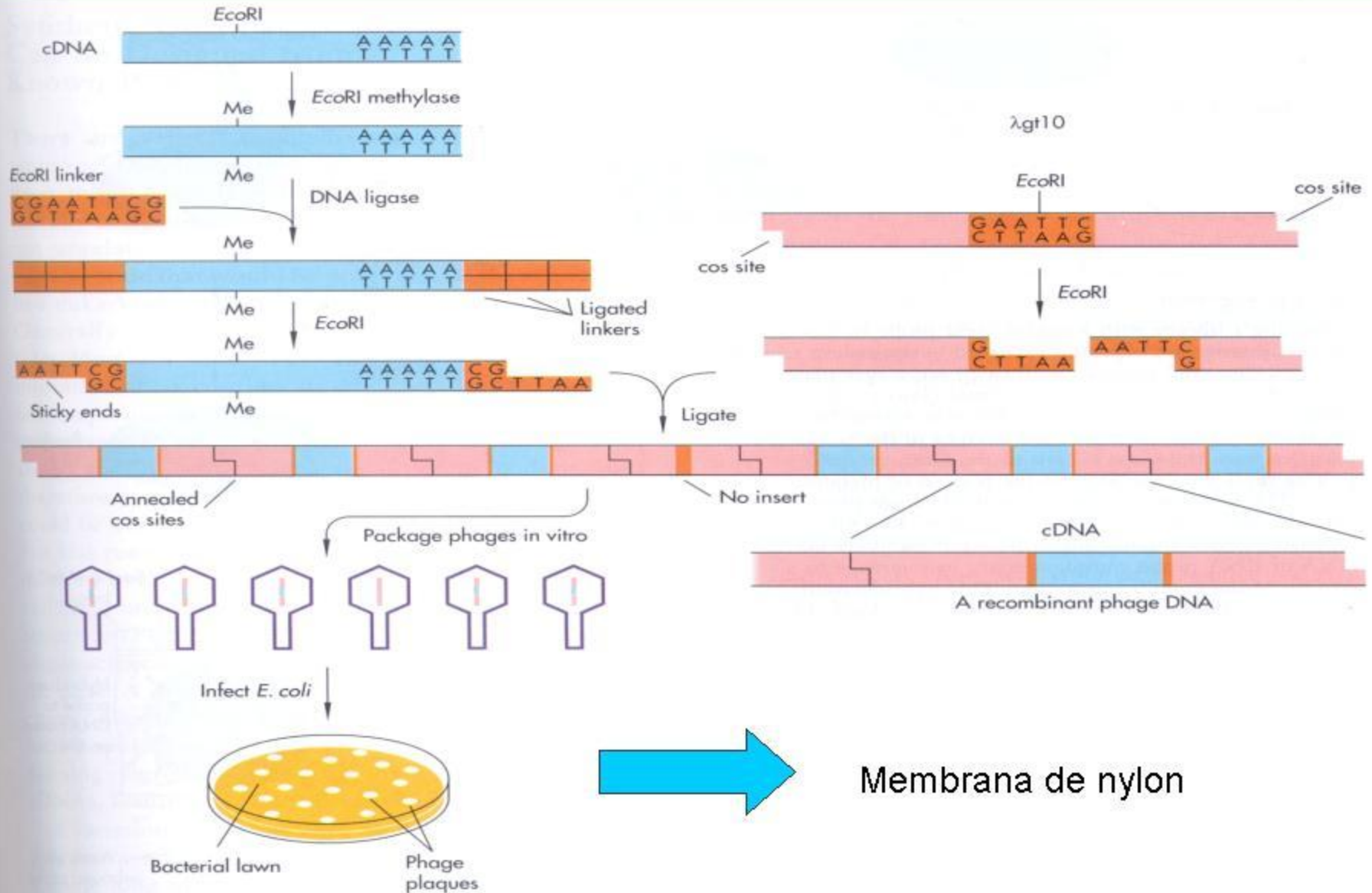
Sequência
completa do gene

Utilizar sonda de
oligonucleotídeos
derivado de uma
proteína

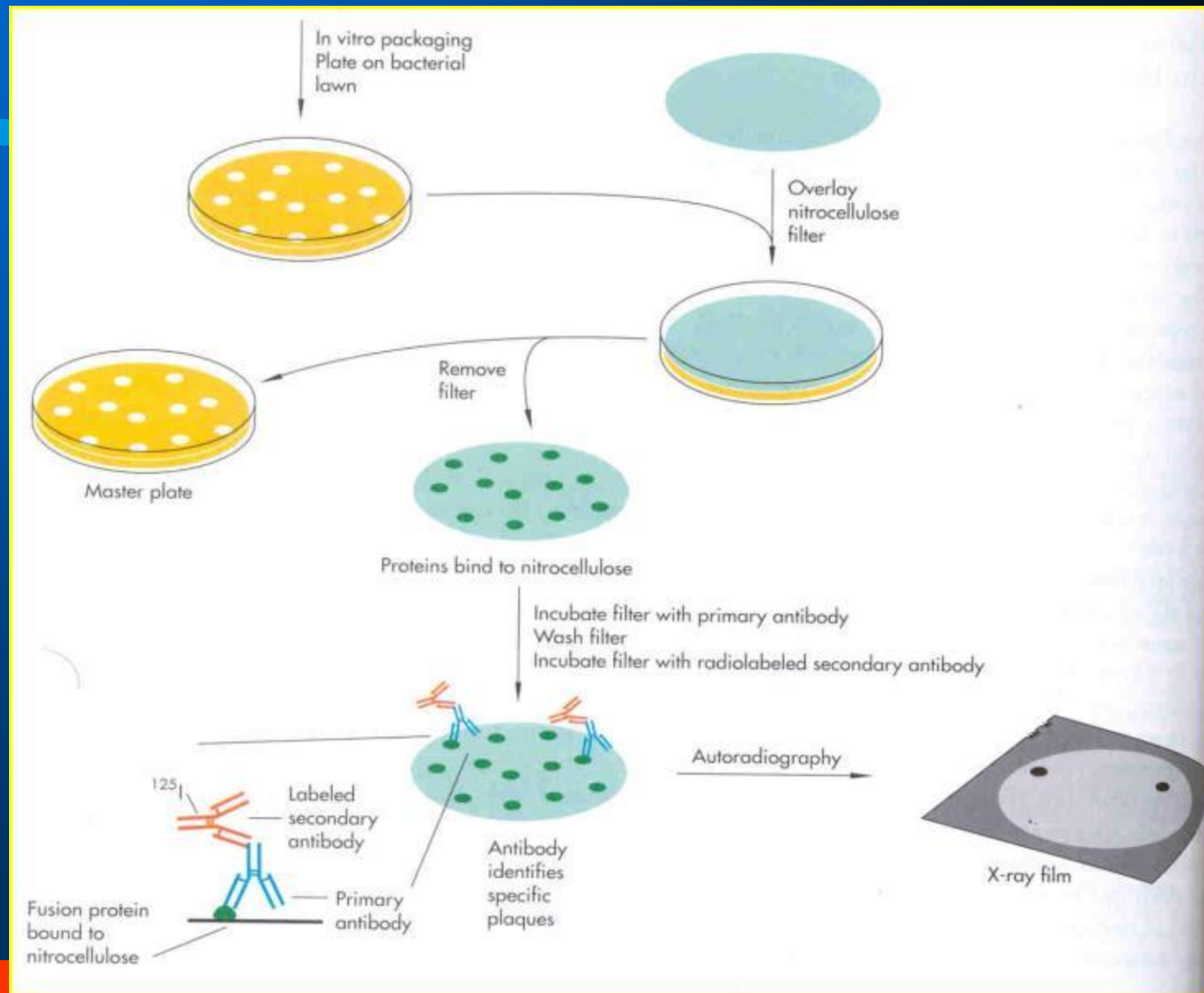
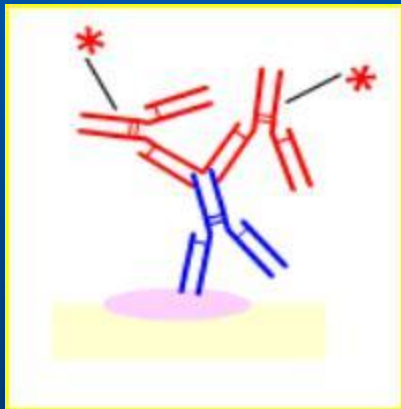
{ Codon degenerado
Conhecer cerca de
6aa contíguos

Anticorpos

1- Detecção do produto do gene pelo uso de anticorpos



1- Detecção do produto do gene pelo uso de anticorpos



2- Detecção do DNA através da técnica de hibridização

HIBRIDIZAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

- É a formação de molécula fita dupla, através do pareamento de duas fitas de DNA ou uma de DNA e outra de RNA complementares, mas de origens diferentes
- Hibridização # Renaturação

SONDA de DNA

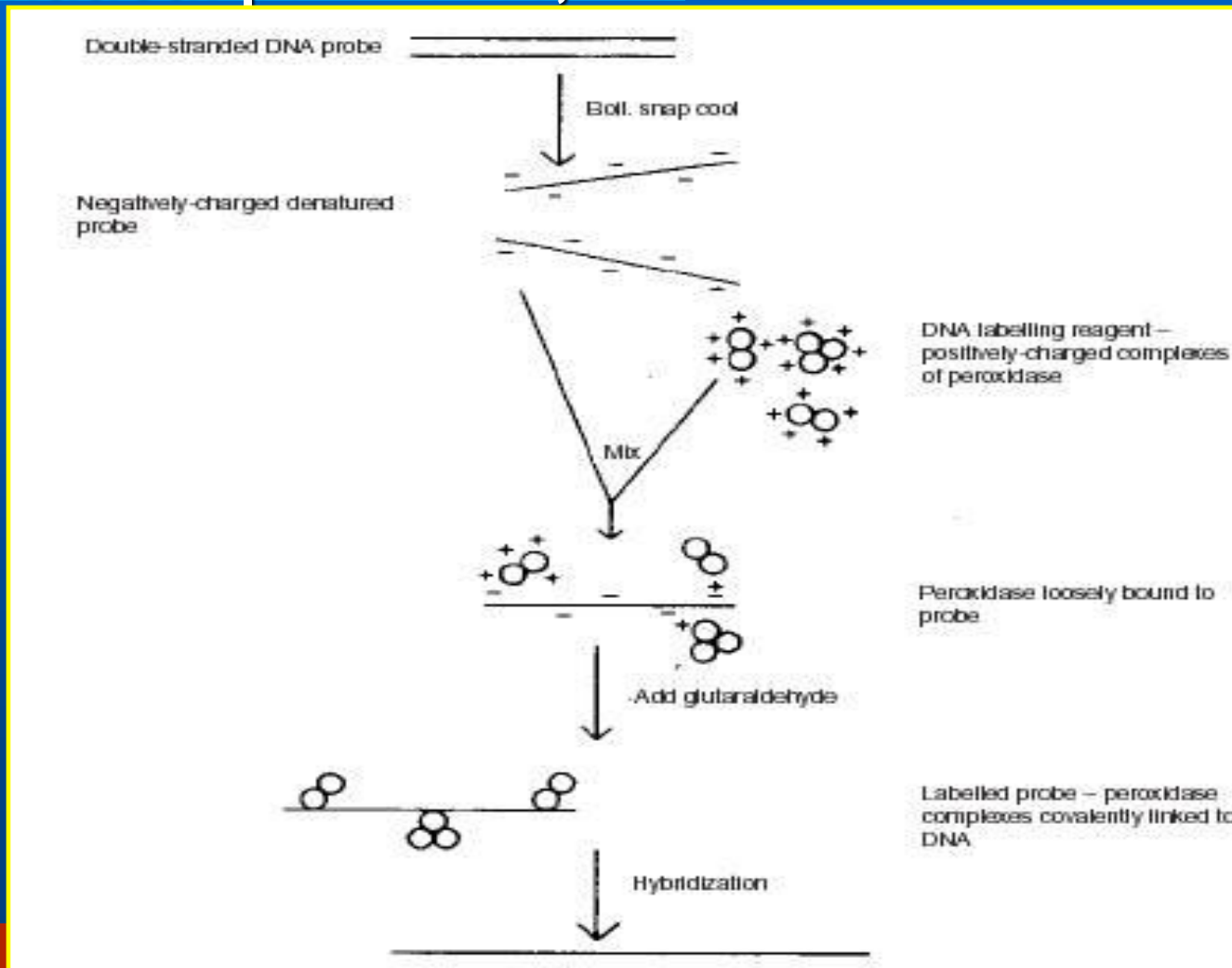
- Sequência de DNA Marcada

Marcação da Sonda de DNA

- Enzimática: peroxidase, fosfatase alcalina**

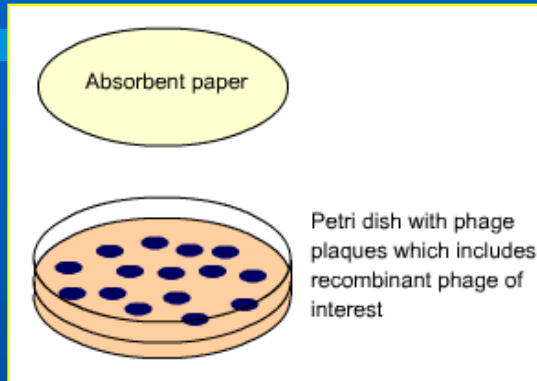
Marcação da Sonda de DNA

- Enzimática: peroxidase, fosfatase alcalina

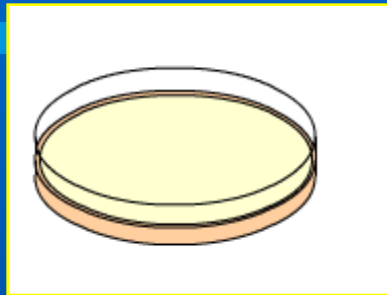


2- Detecção do DNA através da técnica de hibridização

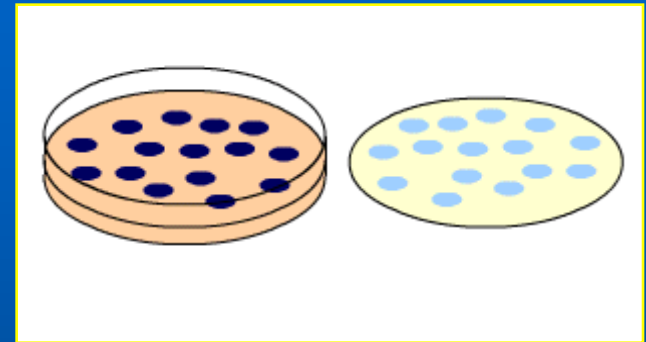
1



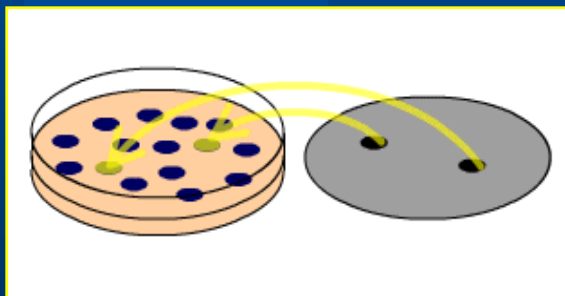
2



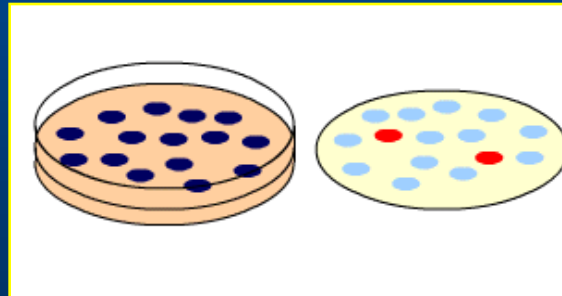
3



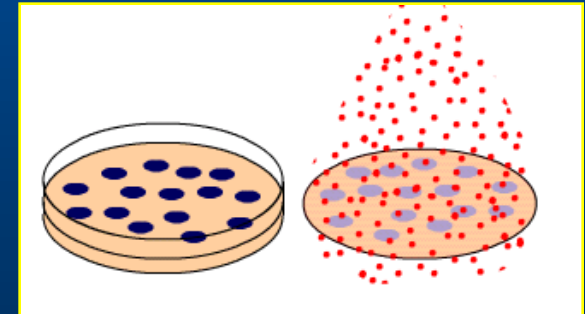
6



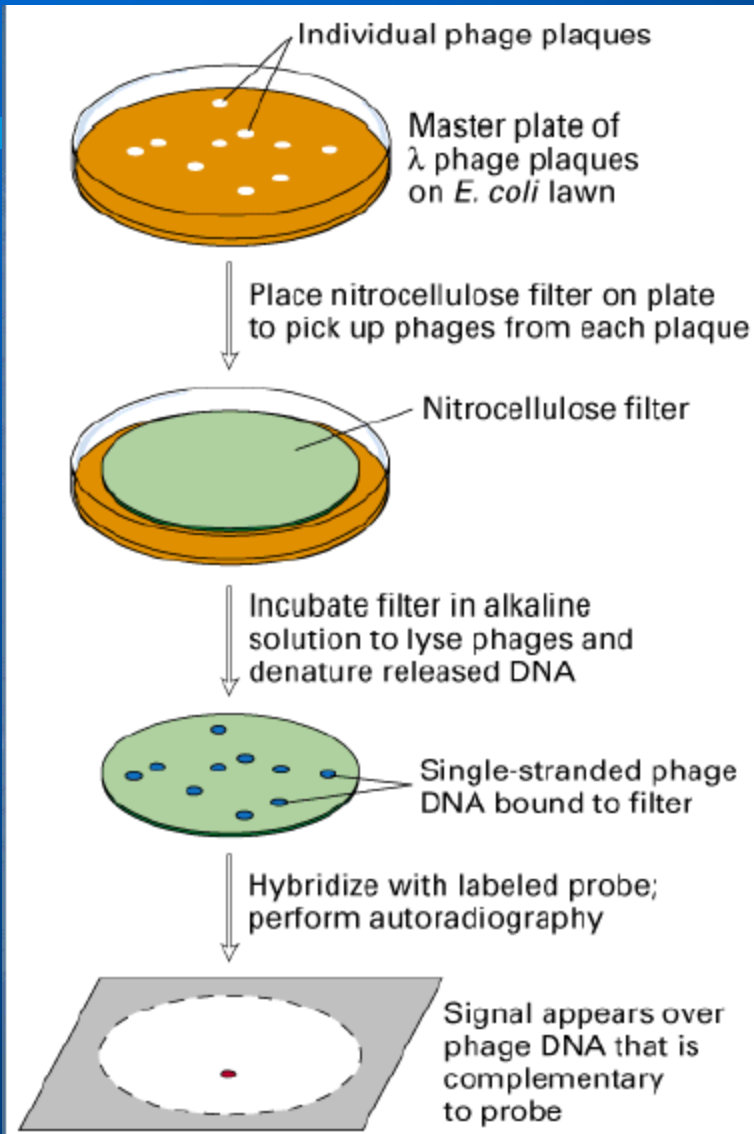
5



4



2- Detecção do DNA através da técnica de hibridização



Caracterização da sequência encontrada

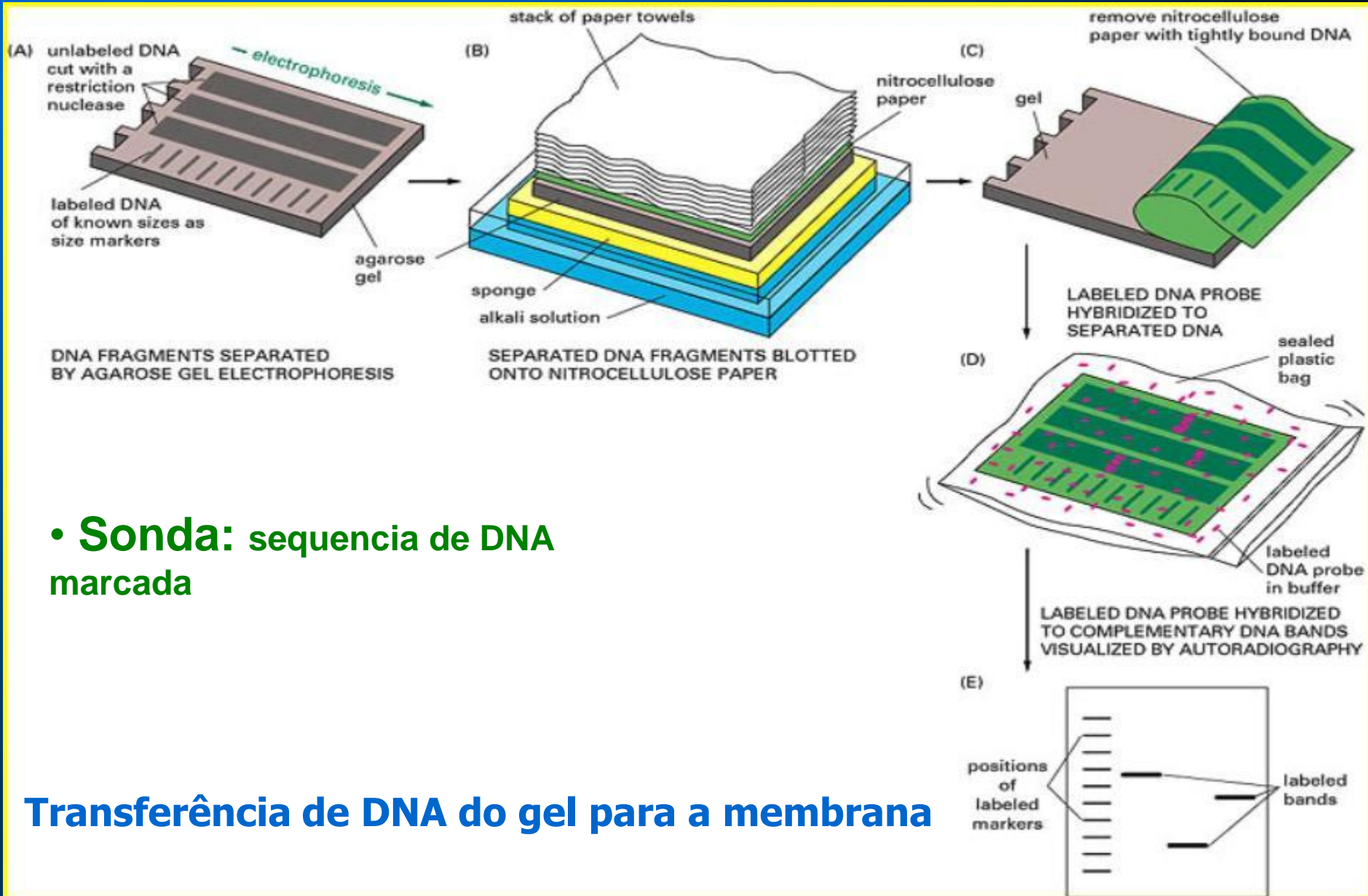
- Sequenciamento de DNA
- PCR
- Expressão da sequência codificadora

Southern Blot - DNA

Northern Blot - RNA

Western Blot - Proteína

Southern Blot



- **Sonda:** sequencia de DNA marcada

Transferência de DNA do gel para a membrana